

Theoretische und experimentelle Untersuchungen zur
Inhibition des Enzyms Aldose Reduktase

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

dem

Fachbereich Pharmazie
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Oliver Krämer

aus Siegen

Marburg/Lahn 2003

Vom Fachbereich Pharmazie der Philipps-Universität Marburg

als Dissertation angenommen am: 28.05.03

Erstgutachter: Prof. Dr. G. Klebe

Zweitgutachter: Prof. Dr. M. Schlitzer

Tag der mündlichen Prüfung: 28.05.03

Die dieser Arbeit zugrundeliegenden Untersuchungen wurden auf Anregung von Herrn Prof. Dr. Gerhard Klebe in der Zeit von September 1999 bis Januar 2003 am Institut für Pharmazeutische Chemie des Fachbereiches Pharmazie der Philipps-Universität Marburg durchgeführt.

Danksagung

- Prof. Dr. Gerhard Klebe danke ich für die interessante Themenstellung, die gute Betreuung und die gewährte Freiheit bei der Bearbeitung des Themas.
- Dr. Christoph Sottriffer danke ich für die exzellente Einführung in das Gebiet der MD-Simulationen, seine stete Hilfsbereitschaft, die vielen hilfreichen Diskussionen und das sichere Geleit durch die Bergwelt der Dolomiten.
- Hans-Dieter Gerber danke ich für die Synthese der Verbindungen und seine stets aufmunternden Worte.
- Dr. Alberto D. Podjarny danke ich für viele hilfreiche Diskussionen und die sehr gute Zusammenarbeit.
- Alexandra Cousido und Isabelle Hazemann danke ich für die Expression und Aufreinigung der für die mikrokalorimetrischen Messungen benötigten Proteinmengen.
- André Mitschler danke ich für die Einführung in die Geheimnisse der Proteinkristallisation sowie für die Messung des HD04-Datensatzes.
- Dr. Andreas Heine und Prof. Dr. Milton Stubbs danke ich für die Hilfe bei allen Fragen der Röntgenkristallographie.
- Dr. John Ladbury danke ich für die Ermöglichung eines Aufenthaltes in seinem Labor am University College London und die hilfreichen Diskussionen. Dr. Ronan O'Brien danke ich für die exzellente fachliche Betreuung während dieser Zeit.
- Ich danke allen Literaturarbeitern/innen die an der Entstehung dieser Arbeit beteiligt waren.
- Ich danke allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe für die angenehme Arbeitsatmosphäre.
- Meinen Eltern sei an dieser Stelle für die Ermöglichung meines Studiums und für ihre stete Fürsorge gedankt.

Darin besteht das Wesen der Wissenschaft. Zuerst denkt man an etwas, das wahr sein könnte. Dann sieht man nach, ob es der Fall ist und im allgemeinen ist es nicht der Fall.

Bertrand Russell (1872-1970)

Das Schönste, was wir entdecken können, ist das Geheimnisvolle.

Albert Einstein (1879-1955)

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Aufsätze

- Oliver Krämer, Isabelle Hazemann, Alberto D. Podjarny, Gerhard Klebe, *Ultra-High Resolution Drug Design III: Virtual Screening for Inhibitors of Human Aldose Reductase*, Proteins: Structure, Function and Genetics, akzeptiert.
- Christoph A. Sotriffer, Oliver Krämer, Gerhard Klebe, *Ultra-high resolution drug design IV: Probing flexibility and "induced-fit" phenomena in aldose reductase by comparative crystal structure analysis and molecular dynamics simulations*, Proteins: Structure, Function and Genetics, eingereicht.

Tagungsbeiträge

- Oliver Krämer, Isabelle Hazemann, Alberto D. Podjarny, Gerhard Klebe, *Thermodynamic Characterization of Ligand Binding to the Enzyme Aldose Reductase*, Poster, European Conference on Current Trends in Microcalorimetry, Dublin (Irland), August **2002**.
- Oliver Krämer, *Virtual Screening of Novel Aldose Reductase Inhibitors*, Vortrag, 16. Darmstädter Molecular-Modelling-Workshop, Darmstadt, Mai **2002**.

Abkürzungsverzeichnis

ACD	Available Chemicals Directory
AR	Aldose Reduktase
ARI	Aldose Reduktase-Inhibitor
DFT	Dichtefunktionaltheorie
FEP	Free Energy Perturbation
hAR	humane Aldose Reduktase
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure
HTS	High-Throughput-Screening
ITC	Isothermale Titrations Kalorimetrie
k.A.	keine Angabe(n)
MM	Molekularmechanik
MD	Molekulardynamik
NADP(H)	β -Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat
NCI	National Cancer Institute
NPT	constant Number of particles, Pressure and Temperature
QM	Quantenmechanik
rms	root mean square
rmsd	root mean square deviation
SBDD	Structure-based Drug Design
SDH	Sorbitol Dehydrogenase
TRIS	N-Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
vdW	van der Waals
VS	Virtual Screening

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	3
1.1	<i>Rationales Wirkstoffdesign</i>	3
1.2	<i>Rezeptorflexibilität</i>	3
1.3	<i>Aufgabenstellung</i>	3
2	Diabetes mellitus	3
2.1	<i>Spätfolgen des Diabetes mellitus</i>	3
2.2	<i>Sorbitol-Stoffwechselweg</i>	3
3	Stand der Kenntnisse	3
3.1	<i>Aldose Reduktase</i>	3
3.2	<i>Kristallstrukturen</i>	3
3.3	<i>Inhibitoren der Aldose Reduktase</i>	3
3.3.1	Zyklische Imide	3
3.3.2	Carbonsäuren	3
3.4	<i>Untersuchungen zum Mechanismus</i>	3
3.5	<i>Struktur basierendes Wirkstoffdesign</i>	3
4	Ergebnisse und Diskussion	3
4.1	<i>Vergleichende Kristallstruktur-Analyse und MD-Simulationen</i>	3
4.1.1	Introduction	3
4.1.2	Materials and Methods	3
4.1.3	Results and Discussion	3
4.1.4	Conclusions	3
4.2	<i>Datenbanksuche basierend auf IDD594-Bindungsmodus</i>	3
4.2.1	Introduction	3
4.2.2	Data Analysis, Methods and Results	3
4.2.3	Discussion	3
4.2.4	Conclusions	3
4.3	<i>Datenbanksuche unter Berücksichtigung multipler Bindungsmodi</i>	3
4.3.1	Ligand basierender Ansatz	3
4.3.2	Durchführung der Datenbanksuche	3
4.3.3	Diskussion	3

4.4	<i>Optimierung des Inhibitors RJC03373</i>	3
4.5	<i>Kristallstruktur der hAR im Komplex mit dem Inhibitor HD04</i>	3
4.6	<i>Thermodynamische Messungen</i>	3
4.6.1	Bestimmung der Bindungskonstanten	3
4.6.2	Änderung der Protonierungszustände bei der Bindung	3
4.6.3	Oxidationszustand des Kofaktors	3
4.6.4	Diskussion	3
5	Zusammenfassung und Ausblick	3
6	Material und Methoden	3
6.1	<i>Chemikalien und Enzym</i>	3
6.2	<i>Enzymassay</i>	3
6.3	<i>Isothermale Titrationskalorimetrie</i>	3
6.3.1	Beschreibung des Gerätes	3
6.3.2	Energetische Betrachtung des Bindungsvorganges	3
6.3.3	Bestimmbare Größen	3
6.3.4	Durchführung der Messungen	3
6.4	<i>Methoden des computergestützten Wirkstoff-Designs</i>	3
6.4.1	Berechnung von günstigen Wechselwirkungsfeldern in der Bindetasche	3
6.4.2	Generierung von Datenbanken für das virtuelle Screening	3
6.4.3	UNITY-Pharmakophor-Generierung	3
6.4.4	Proteinüberlagerung	3
6.4.5	Molekülüberlagerung und Ähnlichkeitsvergleich	3
6.4.6	Docking-Verfahren	3
6.4.7	Hierarchische Datenbanksuchen	3
7	Literaturverzeichnis	3

1 Einleitung

1.1 Rationales Wirkstoffdesign

Die Entschlüsselung des menschlichen Genoms (Lander et al. 2001; Venter 2003; Venter et al. 2001; Waterston et al. 2002; Waterston et al. 2003) stellt den Beginn eines neuen Zeitalters für die Arzneimittelforschung dar. Durch das Humane Genom Projekt konnten die Sequenzen von ca. 30.000 Genen entschlüsselt werden. Obwohl die genaue Anzahl der sich darunter befindenden Zielmoleküle (*Targets*) noch nicht bekannt ist, wird sie wesentlich höher liegen als die heute ca. 500 Zielmoleküle, an denen die im Markt befindlichen Arzneistoffe ihre Wirkung entfalten (Drews 2000a; Drews 2000b). Damit ist klar, dass in den kommenden Jahren die Identifizierung und Validierung von geeigneten neuen *Targets* eine wesentliche Herausforderung für die Pharmazeutische Forschung sein wird (Swindells et al. 2002).

Ist dies geleistet, kann die Suche nach einer Leitstruktur für Inhibitoren dieses Zielmoleküls beginnen. Eine derzeit häufig angewendete Strategie ist die *in vitro*-Testung großer Molekülbibliotheken auf Aktivität (*High-Throughput Screening*, HTS) (Inglese 2002; Smith 2002). In der Verbindung mit kombinatorischer Chemie (Oliver et al. 1999) werden Substanzbibliotheken synthetisiert und mit geeigneten Assays auf ihre Wirksamkeit getestet (Carell et al. 1995). Durch automatisierte Verfahren ist es möglich, in kurzer Zeit eine sehr große Anzahl an Verbindungen experimentell zu überprüfen. Bereits in diesem Jahr wird es möglich sein, standardmäßig eine Million Verbindungen pro *Target* in wenigen Tagen zu testen (Bajorath 2002). Die Trefferquoten dieses Ansatzes sind jedoch ernüchternd und liegen häufig unter einem Promille der Anzahl eingesetzter Substanzen (Lahana 1999; Sills 1998).

Eine alternative Strategie ist das Struktur basierende Wirkstoff-Design, bei dem ausgehend von der dreidimensionalen (3D) Struktur des molekularen Rezeptors, am besten im Komplex mit bereits bekannten Liganden, Inhibitoren rational entworfen oder selektiert werden. Nach der experimentellen Testung auf Aktivität und der strukturellen Untersuchung der potentiellen Inhibitoren, fließen dabei gewonnene Erkenntnisse als neue Information zurück in den Design-Zyklus (Abbildung 1) (Klebe 2000).

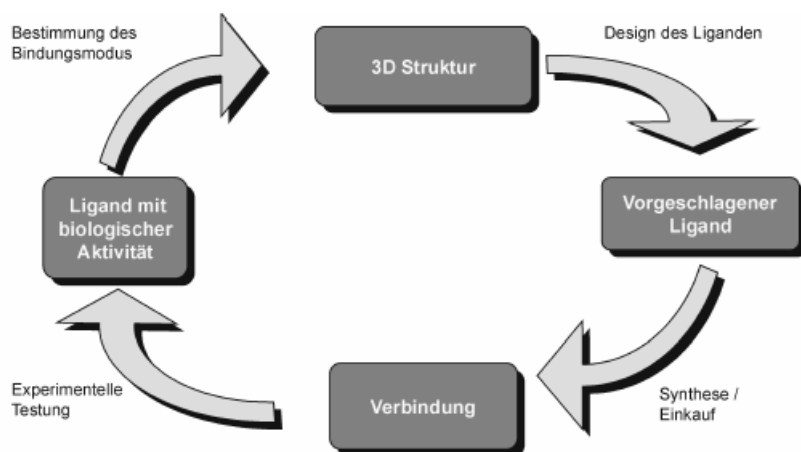


Abbildung 1. Prinzip des Struktur basierenden Wirkstoffdesigns.

Eine große Hilfe beim Entwurf neuer Inhibitoren (*de novo*-Design) oder der Optimierung bereits bekannter Inhibitoren ist die Identifizierung und Visualisierung von bevorzugten Wechselwirkungsbereichen (*hot spots*) innerhalb der Bindetasche mit geeigneten Computermethoden (Böhm 1992; Gohlke et al. 2000b; Goodford 1985; Miranker et al. 1995; Verdonk et al. 1999; Verdonk et al. 2001). Diese Informationen können alternativ genutzt werden, um Kriterien für das virtuelle Durchmustern (*virtual screening*) großer Datenbanken abzuleiten. Die in den Datenbanken gespeicherten kleinen Moleküle werden einer Reihe von hierarchischen Filterschritten unterworfen. In einem abschließenden bewertenden Schritt werden die verbleibenden Moleküle häufig durch so genannte Docking-Programme in die Proteinbindetasche eingepasst (Good 2001; Sotriffer et al. 2003; Walters et al. 1998). Gängige Docking-Programme betrachten die Bindetasche als rigide, wohingegen der Ligand flexibel behandelt wird (Ewing et al. 2001; Jones et al. 1997; Rarey et al. 1996a). Durch zunehmend schnellere Computer ist es mittlerweile bis zu einem gewissen Grad möglich, Proteinflexibilität während des Dockings zu berücksichtigen (s. Kapitel 1.2).

Entscheidend für den Erfolg des virtuellen Screenings ist eine zuverlässige Vorhersage der Affinität eines „Screening-Kandidaten“ zu seinem Rezeptor (*scoring*) (Gohlke et al. 2002a). Vergleichende Studien haben gezeigt, dass die vorhandenen Bewertungsfunktionen für unterschiedliche Proteine unterschiedlich gute Ergebnisse liefern (Bissantz et al. 2000; Stahl et al. 2001). Auch die Güte der Vorhersage der Docking-Programme ist vom jeweiligen Protein abhängig. Deshalb muss für jeden Rezeptor eine günstige Kombination von Docking-Programm und Bewertungsfunktion gefunden werden. Die Verwendung mehrerer Bewertungsfunktionen kann sich als vorteilhaft erweisen, insbesondere wenn die Vorhersagen der verschiedenen Funktionen in Einklang stehen (*consensus-scoring*).

Die durch virtuelles Screening aufgefallenen Verbindungen werden entweder kommerziell erworben oder synthetisiert und anschließend in einem Bioassay auf ihre Affinität überprüft. Im letzten Schritt wird im Idealfall die vorhergesagte Bindungsgeometrie röntgenkristallographisch oder NMR-spektroskopisch validiert, um den Design-Zyklus zu schließen. Die gewonnenen Erkenntnisse können in einen neuen Zyklus einfließen und so die weitere Optimierung der Inhibitoren leiten.

Nach der kompletten Sequenzierung des humanen Genoms sowie der Genome weiterer Organismen wurden zahlreiche *Structural Genomics* Initiativen gegründet. Diese zielen darauf ab, im großen Maßstab durch automatisierte Prozesse Gene zu klonieren, zu transformieren, zu exprimieren und die erhaltenen Proteine anschließend zu reinigen, um so durch Hochdurchsatz-NMR-Spektroskopie oder -Röntgenkristallographie neue Proteinstrukturen zu bestimmen (Mittl et al. 2001). Es ist davon auszugehen, dass die Zahl der öffentlich zugänglichen 3D-Protein-Strukturen von zur Zeit über 20.000 (PDB, Stand: März 2003) weiter exponentiell ansteigen wird (Berman et al. 2002; Bernstein et al. 1977; Westbrook et al. 2003).

In den letzten Jahren sind einige Erfolge mit dem Struktur basierenden Design von Wirkstoffen erzielt worden (Lyne 2002). So konnten z.B. subnanomolare Inhibitoren der Carboanhydrase mit einem virtuellen Screening gefunden werden (Grüneberg et al. 2002). Die mit virtuellem Screening erreichbaren Trefferquoten scheinen im Allgemeinen höher zu sein als beim Hochdurchsatz-Screening, wie zwei kürzlich veröffentlichte Studien (Doman et al. 2002; Paiva et al. 2001) belegen. Nachdem HTS und virtuelles Screening lange als komplementäre Ansätze betrachtet wurden, rückt mittlerweile immer mehr die kombinierte Anwendung dieser Methoden in den Vordergrund, um dabei bestehende Synergien zu nutzen (Bajorath 2002; Böhm et al. 2000; Good et al. 2000). Durch das nachträgliche *Docking* von Treffern aus einem HTS nach Angiogenin-Inhibitoren konnte die Hitrate des HTS um mehr als das Sechsfache gesteigert werden (Jenkins et al. 2003). Insbesondere befanden sich unter den von HTS und VS im Konsens positiv bewerteten Verbindungen nur sehr wenige falsch positiv bewertete Verbindungen. Möglich ist auch, vor der tatsächlichen Synthese und experimentellen Testung, den chemischen Suchraum durch das Durchmustern virtueller Bibliotheken, die auf Struktur basierenden oder kombinatorischen Prinzipien beruhen, einzuschränken. Umgekehrt können durch das HTS großer Datensätze Informationen über Struktur-Wirkungsbeziehungen von Liganden gesammelt werden. Die Auswertung dieser Datensätze kann dann mit Methoden des Computer unterstützten Wirkstoff-Designs erfolgen.

Das Ziel ist, durch die Nutzung der Synergie-Effekte in Zukunft schneller und kostengünstiger neue Arzneistoffe entwickeln zu können.

1.2 Rezeptorflexibilität

Wie bereits erwähnt, ist aufgrund der begrenzten Rechenkapazitäten die Berücksichtigung einer einzelnen fixierten Proteinstruktur der Standard beim Einpassen des Liganden in die Bindetasche. Eine solche einzelne Konformation kann aber nur im Fall eines sehr rigiden Systems eine adäquate Darstellung des Proteins sein. Diese Repräsentation entspricht der Vorstellung, die dem von Erwin Fischer postulierten „Schlüssel-Schloss-Prinzip“ zugrunde liegt: An das in einer wohldefinierten Konformation vorliegende Protein bindet der Ligand in optimaler Konformation und räumlicher Orientierung, um komplementäre Wechselwirkungen mit dem Protein einzugehen. Realistischer ist die Vorstellung, dass die meisten Proteine komplizierte Energie-Hyperflächen besitzen, auf denen viele konformativ und energetisch unterschiedliche Zustände auftreten können. Die Faltung eines Proteins kann man sich als einen Vorgang vorstellen, bei dem das Protein aus einer Vielzahl ungünstiger Zustände über multiple Pfade in den gefalteten Zustand übergeht. Obwohl es (bei einem rigiden Protein) so aussehen mag, als ob es nur einen gefalteten Zustand (nur ein Minimum) gäbe, zeigt sich bei genauerer Betrachtung, dass dieser gefaltete Zustand aus mehreren strukturell ähnlichen und energetisch nahezu entarteten Konformationen des Proteins besteht, die ein Ensemble bilden (Abbildung 2). Eine einzelne Proteinstruktur ist kaum in der Lage dieses Ensemble korrekt zu beschreiben, auch wenn eine Kristallstruktur das zeitliche Mittel mehrerer Konformationen wiedergibt.

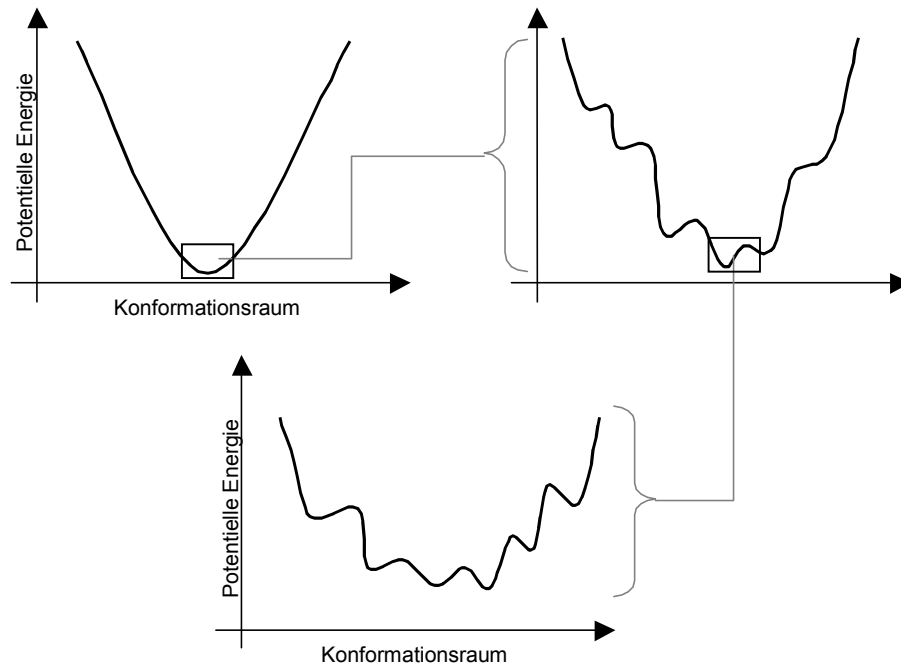


Abbildung 2. Energiehyperfläche eines realen Proteins. Der günstigste Zustand besteht aus einem Ensemble strukturell ähnlicher und energetisch nahezu entarteter Konformationen. Entnommen aus (Sotriffer in press).

Die Form der Energie-Hyperfläche wird durch eine Reihe umgebungsabhängiger Variablen (Ionenstärke, pH, Temperatur, etc.) bestimmt. Auch durch die Einführung eines Liganden wird das System beeinflusst. Man spricht in diesem Zusammenhang von einer induzierten Anpassung (*induced-fit*) des Proteins (Koshland Jr. 1958). In den letzten Jahren wurde die Theorie zum Auftreten verschiedener Proteinkonformationen bei der Bindung unterschiedlicher Liganden durch die Arbeiten von Freire et al. (Freire 1998) und Ma et al. (Ma et al. 1999) erweitert und an neue Erkenntnisse angepasst. Das Protein wird nicht mehr als fixierter Zustand betrachtet, der durch Einführung des Liganden deformiert wird. Stattdessen geht man davon aus, dass das Protein per se in der Lage ist, sämtliche beobachtbaren Konformationen einzunehmen – einige entsprechend dem nativen (gefalteten) Zustand, andere entsprechend dem komplexierten Zustand nach induzierter Anpassung. Der Ligand selektiert dann lediglich die für seine Bindung günstigste Proteinkonformation und stabilisiert diese. Ist die Bindung des Liganden an den Zustand nach induzierter Anpassung bevorzugt, dann verschiebt sich die mittlere Struktur des Proteins zu diesem Zustand. Das Auftreten von multiplen Bindungsmodi eines Liganden wird verständlich, da es mehr als eine „angepasste“ Proteinkonformation mit ähnlich günstiger Energie für diesen Liganden geben kann. Zur korrekten Abschätzung der Bindungsaffinität eines solchen Liganden müssten sämtliche populierten Zustände betrachtet werden.

Welche Faktoren bestimmen die Bindungsaffinität eines Liganden? Wie generell bei solchen Gleichgewichtsprozessen müssen die Energien der Reaktanden vor und nach der Bindung verglichen werden (s. Abbildung 23, Seite 3). Im Gleichgewicht tragen unter Standardbedingungen enthalpische und entropische Anteile zur freien Bindungsenergie bei (Gleichung 1).

Gleichung 1
$$\Delta G_{\text{bind}}^{\circ} = \Delta H^{\circ} - T\Delta S^{\circ}$$

Die für die Änderung der Proteinkonformation beim Übergang von der freien zur gebundenen Konformation benötigte freie Energie $\Delta G_{\text{conf}}^{\circ}$ muss bei der Berechnung der Bindungsenergie $\Delta G_{\text{bind}}^{\circ}$ berücksichtigt werden (Gleichung 2). $\Delta G_{\text{rigide}}^{\circ}$ ist die freie Bindungsenergie unter der Annahme, dass die freie und die gebundene Konformation des Proteins identisch sind.

Gleichung 2
$$\Delta G_{\text{bind}}^{\circ} = \Delta G_{\text{rigide}}^{\circ} + \Delta G_{\text{conf}}^{\circ}$$

Wie groß ist die für die Konformationsänderung benötigte Energie? Diese Frage ist von essentieller Bedeutung für das Wirkstoffdesign bei flexiblen Proteinen. Ist die für die Konformationsänderung benötigte Energie vernachlässigbar, dann wird die intrinsische Bindungsenergie $\Delta G_{\text{rigide}}^{\circ}$ des Liganden zum bestimmenden Faktor. Der Ligand wird dann tatsächlich die für seine Bindung günstigste Proteinkonformation selektieren. Stellt $\Delta G_{\text{conf}}^{\circ}$ jedoch einen bedeutenden Beitrag dar, dann sind bei einem flexiblen Protein zwei Extremfälle denkbar, die beide zu einer günstigen Bindungsenergie führen: (1) ein Ligand mit mäßiger intrinsischer Affinität ($\Delta G_{\text{rigide}}^{\circ} < 0$) bindet bevorzugt an eine energetisch sehr günstige Konformation des Proteins; (2) ein Ligand mit hoher intrinsischer Affinität ($\Delta G_{\text{rigide}}^{\circ} \ll 0$) bindet an eine weniger günstige (und damit weniger populierte) Konformation des Proteins. Den günstigsten Fall, der folglich zu einer sehr großen Bindungsenergie führen sollte, stellt natürlich die Bindung eines Liganden mit hoher intrinsischer Affinität an eine günstige Proteinkonformation dar.

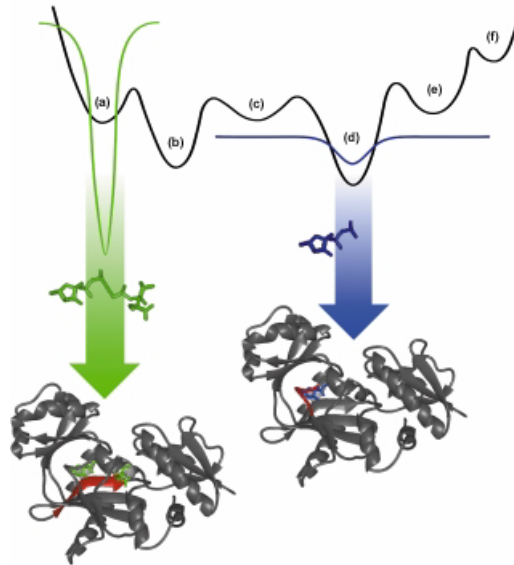


Abbildung 3. Ein Protein existiert in Lösung in einer Reihe von verschiedenen Konformationen (a)-(f) mit unterschiedlichen Energien. Die beiden energetisch günstigsten Zustände (b) und (d) sind im ungebundenen Zustand am häufigsten populiert. Ein Ligand (dargestellt in grün) mit einer hohen intrinsischen Affinität ($\Delta G^{\circ}_{\text{rigide}} \ll 0$) bindet bevorzugt an die Proteinkonformation (a), da die entsprechend der Energiedifferenz zwischen den Zuständen (a) und (d) für die Konformationsänderung benötigte Energie ($\Delta G^{\circ}_{\text{conf}} > 0$) überkompensiert wird. Dadurch wird die Population der Proteinkonformationen im Vergleich zum ungebundenen Zustand verschoben (*induced-fit*). Ein Ligand mit mäßiger intrinsischer Affinität (dargestellt in blau) bindet bevorzugt an die schon im ungebundenen Zustand am häufigsten populierte Konformation. Entnommen aus (Carlson 2002a).

Im Laufe der Jahre sind eine Reihe von Methoden entwickelt worden, um die Rezeptorflexibilität im Rahmen des *Molecular Modeling* zu berücksichtigen. Einen sehr guten Überblick geben die Artikel von Halperin et al. (Halperin et al. 2002) und Carlson (Carlson 2002a; Carlson 2002b; Carlson et al. 2000). Die verschiedenen Ansätze lassen sich grob nach dem Maß der berücksichtigten Flexibilität klassifizieren. Die Ansätze reichen von der Berücksichtigung verschiedener Seitenketten-Konformationen hin bis zu der Simulation der Bewegung von ganzen Schleifen oder Domänen. Im Bereich des Struktur basierenden Wirkstoffdesigns haben sich vermehrt Methoden durchgesetzt, die multiple Proteinstrukturen verwenden, um die Flexibilität des Rezeptors zu beschreiben. Dieses Konzept nutzt auch das in dieser Arbeit verwendete Programm FLEXE (Claussen et al. 2001). Entweder aus experimentellen Daten (Kristallstrukturen, NMR) entnommene oder Computer generierte Proteinkonformationen werden zu einer Rezeptorbeschreibung vereint, wobei die im Ensemble vertretenen Alternativen zu neuen Proteinkonformationen kombiniert werden.

1.3 Aufgabenstellung

Thema der vorliegenden Arbeit ist die Untersuchung der Inhibition des Enzyms Aldose Reduktase (AR), das im Zusammenhang mit der Entstehung von Spätfolgen des Diabetes mellitus (s. Kap. 2.1) steht. Aufgrund intensiver Bemühungen auch von Seiten der Pharmaindustrie sind im Laufe der Jahre bereits eine Reihe von Inhibitoren der Aldose Reduktase identifiziert worden (s. Kapitel 3.3). Die strukturellen und mechanistischen Kenntnisse zur Bindung von ARIs werden in Kapitel 3.2 und 3.4 vorgestellt. Die bisher publizierten Arbeiten zu dem Struktur basierenden Design von ARIs werden in Kapitel 3.5 zusammengefasst.

Eine Besonderheit der Aldose Reduktase liegt in der ausgeprägten Anpassungsfähigkeit ihrer Bindetasche bei der Ligandbindung. Das Ausmaß dieser Rezeptorflexibilität wurde durch den ausführlichen Vergleich bekannter Kristallstrukturen und mit Hilfe von molekulardynamischen Simulationen untersucht (Kapitel 4.1).

Wesentliches Ziel der vorliegenden Arbeit war die Suche nach neuen Inhibitoren der Aldose Reduktase. Das virtuelle Screening wurde dabei zunächst auf eine rigide Proteinstruktur beschränkt (Kapitel 4.2). Anschließend wurde untersucht, inwieweit neue Ansätze in der Lage sind, die Flexibilität des Rezeptors bei der virtuellen Suche zu berücksichtigen (Kapitel 4.3). In beiden Datenbanksuchen konnten neue Inhibitoren der Aldose Reduktase im mikromolaren Bereich identifiziert werden.

Ein bereits bekannter Inhibitor wurde hinsichtlich seiner Affinität optimiert (Kapitel 4.4). Die Struktur des so erhaltenen Inhibitors im Komplex mit humaner Aldose Reduktase konnte aufgeklärt werden und dient als Grundlage für eine Design-Strategie zur weiteren Optimierung des Inhibitors (Kapitel 4.5).

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die mikrokalorimetrische Untersuchung der Ligandbindung (Kapitel 4.6). Anhand der gesammelten thermodynamischen Daten konnten Rückschlüsse auf den Enzym- bzw. Ligandenbindungs-Mechanismus gezogen werden.

2 Diabetes mellitus

Diabetes mellitus ist eine chronische Stoffwechselerkrankung, bei der es durch unzureichende Produktion des Hormons Insulin in den Langerhansschen Inseln (B-Zellen) der Bauchspeicheldrüse oder durch mangelnde Insulinwirksamkeit zu einer Störung des Kohlenhydrat-, aber auch des Fett- und Eiweißstoffwechsels kommt.

Die Häufigkeit des Diabetes mellitus hat in den Industrieländern in den letzten Jahrzehnten in einem solchen Maß zugenommen, dass mittlerweile von einer Epidemie gesprochen werden kann (Zimmet et al. 2001). Diabetes mellitus stellt eine der größten gesundheitlichen Gefährdungen des 21. Jahrhunderts dar. Es wird erwartet, dass die weltweite Anzahl der Patienten mit Diabetes mellitus von zur Zeit etwa 150 Millionen auf 220 Millionen im Jahr 2010 und auf etwa 300 Millionen im Jahr 2024 steigen wird (Amos et al. 1997; King et al. 1998). Die Zunahme steht in Zusammenhang mit der gestiegenen Lebenserwartung und den veränderten Ernährungsgewohnheiten. Bei der Entstehung ist im Allgemeinen das Zusammenwirken einer entsprechenden Erbanlage mit äußeren (exogenen) Einflüssen (Infekte, Stress, hormonelle Einflüsse, Überernährung) Voraussetzung.

Der Diabetes mellitus wird von der Weltgesundheitsorganisation (WHO) in zwei Krankheitsformen unterteilt:

1. Typ-I-Diabetes

Insulinabhängiger Diabetes (IDDM, engl. *insulin-dependent diabetes mellitus*). An diesem juvenilen Typ, verursacht durch (absoluten) Insulinmangel, leiden 20 % der Diabetes mellitus-Patienten.

2. Typ-II-Diabetes

Insulinunabhängiger Diabetes (NIDDM, engl. *non-insulin-dependent diabetes mellitus*). An diesem adulten Diabetes, verursacht durch verminderte Insulinwirkung (relativer Insulinmangel), leiden 80 % der Diabetes mellitus-Patienten.

Gerade bei Jugendlichen ist in den kommenden Jahren eine Zunahme der Typ II Erkrankungen zu erwarten.

Der Entstehung von Typ I liegt eine Schädigung der B-Zellen durch eine entzündliche Reaktion des Inselgewebes (Insulitis) zugrunde, die zum absoluten Insulinmangel führt. Diese Schädigung beruht auf einer Disposition des Immunsystems, bei der es zur Bildung von

Antikörpern gegen die B-Zellen kommt (Autoaggression). Dabei können Virusinfektionen auslösend sein.

Eine häufig beobachtete Vorstufe des manifestierten Typ-II-Diabetes, die durch das gemeinsame Auftreten von Hyperinsulinismus, Hypertonie, Hyperlipoproteinämie und Adipositas („tödliches Quartett“) charakterisiert ist, wird als metabolisches Syndrom oder auch Syndrom X bezeichnet. Typ II weist anfangs vor allem bei Überernährung eine Erhöhung des Blutzuckerspiegels bei zunächst hohem Insulinspiegel (Hyperinsulinämie) durch gesteigerte Sekretion des Hormons auf. Bei überschießender Insulinabsonderung nehmen die Insulinrezeptoren an der Zelloberfläche ab. Dieses führt, wie die durch Überernährung verursachte Fettsucht (Adipositas), zu einer mangelnden Insulinwirkung auf den Blutzucker (relativer Insulinmangel), die Erhöhung des Blutzuckerspiegels wird weiter verstärkt. Die Entdeckung des Proteins Resistin, das von Fettzellen gebildet wird, erklärt möglicherweise den Zusammenhang zwischen Adipositas und dem Auftreten der Insulin-Resistenz (Steppan et al. 2001). Folge des weiter erhöhten Blutzuckerspiegels ist eine erneut gesteigerte Insulinsekretion. Bei erblicher Veranlagung kommt es schließlich zu einer Überforderung der B-Zellen und zum Diabetes mellitus mit absolutem Insulinmangel (Sekundärversagen).

Die Behandlung wird bei Typ II durch Diät und orale Antidiabetika durchgeführt. Bei Typ I und Typ II mit Sekundärversagen wird mit Insulin behandelt.

Die Auswirkungen des Diabetes mellitus können in kurzfristige und langfristige Komplikationen unterteilt werden. Die langfristigen Komplikationen (Spätfolgen) werden in Kap. 2.1 diskutiert.

Die biochemischen Auswirkungen des Diabetes mellitus sind im wesentlichen auf die verminderte Insulinwirkung zurückzuführen. Bei absolutem oder relativem Insulinmangel ist im Rahmen des Kohlenhydratstoffwechsels der Glukosetransport in die Gewebe gestört, daraus resultiert ein Anstieg der Zuckerkonzentration im Blut (Hyperglykämie). Zugleich kommt es zu einer Ausschüttung von Hormonen, die antagonistisch zum Insulin wirken und somit zu vermehrter Glukosebildung führen (Gluconeogenese). Übersteigt die Glukose-Konzentration einen bestimmten Schwellenwert, dann lässt sich Glukose im Harn nachweisen (Glucosurie). Da Zucker nur in gelöster Form ausgeschieden werden kann, geht mit dem Harn eine große Menge von Flüssigkeit und Mineralien verloren. Im Extremfall kann es zu Austrocknungserscheinungen des Körpers kommen (Exsikkose). Blutzuckererhöhung und

vermehrte Flüssigkeitsausscheidung (Polyurie) verursachen verstärkten Durst (Polydipsie). Die Verluste an Flüssigkeit, Salzen und Zucker rufen auch Kreislauf- und Muskelschwäche, Gewichtsverlust und allgemeinen Leistungsabfall hervor. Obwohl viel Zucker im Blut kreist, kann wegen Insulinmangel kein Zucker mehr in die Zellen eintreten. Muskeltätigkeit begünstigt unabhängig von Insulin den Eintritt von Glukose in die Zellen, Fettgewebe hingegen erfordert die Einwirkung von Insulin, woraus sich der größere Insulinbedarf bei Fettleibigkeit erklärt.

Insulinmangel bewirkt auch eine Störung des Fettstoffwechsels. Es kommt zu einem mangelhaften Abbau langkettiger Fettsäuren und damit zur überhöhten Entstehung (Ketogenese) von Ketonen, die im Körper nicht weiter zerlegt werden können. Es kommt zur Ketoacidose. Extreme Stoffwechselentgleisungen münden in das ketoacidotische diabetische Koma.

2.1 Spätfolgen des Diabetes mellitus

Durch die Behandlung mit Insulin lässt sich der Blutzuckerspiegel bei Diabetikern einstellen, wodurch sich deren Lebenserwartung und -qualität entscheidend verbessert. Dennoch erreicht man durch die exogene Zufuhr von Insulin nicht die gleich präzise Regulation des Blutglukosespiegels, wie es die Bauchspeicheldrüse leistet. Infolgedessen treten häufig trotz gut überwachter Insulintherapie Spitzen im Blutzuckerspiegel auf, die eng mit der Entstehung von Spätkomplikationen (diabetisches Spätsyndrom) verknüpft sind. Dazu gehören:

- Makroangiopathien: koronare Herzerkrankungen, Arteriosklerose (periphere arterielle Verschlusskrankheiten)
- Mikroangiopathien: diabetische Retinopathie (nichtentzündliche Netzhauterkrankung), diabetische Nephropathie bzw. diabetische Glomerulosklerose (Schädigung der glomerulären Kapillaren der Niere)
- Diabetische Neuropathie (Befall des peripheren, autonomen und zentralen Nervensystems)
- Diabetische Enzephalopathie (nichtentzündliche Erkrankung des Gehirns)
- Diabetischer Katarakt (grauer Star)

Diese diabetischen Folgeerkrankungen vermindern die Lebensqualität und verkürzen die Lebenserwartung der betroffenen Patienten. Das diabetische Spätsyndrom führt in

Deutschland zu gravierenden Folgen: ca. 17000 Beinamputationen pro Jahr, 2000 Neuerblindungen und etwa 20000 Dialysepatienten sind Diabetiker. Die mittlere Lebenserwartung des Diabetikers, die im statistischen Mittel etwa 1/3 unter dem allgemeinen Durchschnitt liegt, hängt entscheidend von den Spätschäden der Krankheit ab, da das diabetische Koma heute nur noch bei etwa 1 % der Sterbefälle Todesursache ist.

Als wichtigste Ursache für die Entstehung der diabetischen Folgeerkrankungen wird die Hyperglykämie angesehen. Es gibt mehrere Erklärungsansätze, die eine Verknüpfung zwischen der Hyperglykämie und der Entstehung von Spätkomplikationen herstellen (Brownlee 2001):

- Die Hyperglykämie bewirkt eine unspezifische Glykosylierung verschiedenster Proteine. Dies führt zu Aktivitätsverlusten. Die nicht enzymatisch katalysierte Reaktion langlebiger Proteine (Albumin, Kollagen, etc.) führt zur Bildung sog. AGEs (engl. *advanced glycosylated end products*).
- Hyperglykämie führt zu verstärkter enzymatischer Umwandlung von Glukose zu Sorbitol. Diese geschieht im Rahmen des Sorbitol-Stoffwechselweges, dessen erster Schritt von Aldose Reduktase katalysiert wird (s. nächstes Kapitel).
- Hyperglykämie führt zu einer Aktivierung der Protein Kinase C.
- Hyperglykämie führt zu einem erhöhten Fluss durch den Hexosamin-Stoffwechselweg.

2.2 Sorbitol-Stoffwechselweg

Die unzureichende Insulinregulierung kann kurzfristig zu stark erhöhten Blutzuckerspiegeln führen. Dadurch steigt die Glukosekonzentration in Zellen, deren Glukoseaufnahme insulinunabhängig ist, auf unphysiologisch hohe Werte an. Unter diesen Bedingungen erreicht der normalerweise beschrittene glykolytische Abbau, der mit der Hexokinasereaktion beginnt, eine Sättigung und überschüssige Glukose tritt in den Sorbitol-Stoffwechselweg (in der englischsprachigen Literatur meist als *polyol pathway* bezeichnet) ein. Dieser Pfad (s. Abbildung 4), auf dem Glukose in Fruktose umgewandelt wird, verläuft über die beiden Enzyme Aldose Reduktase (AR) und Sorbitol Dehydrogenase (SDH) (Petrash et al. 1994). Diese Enzyme katalysieren den Abbau von Glukose über Sorbitol als Zwischenprodukt zu Fruktose, wobei der erste Schritt mit der Oxidation von NADPH zu NADP⁺, der zweite mit der Reduktion von NAD⁺ zu NADH verknüpft ist.

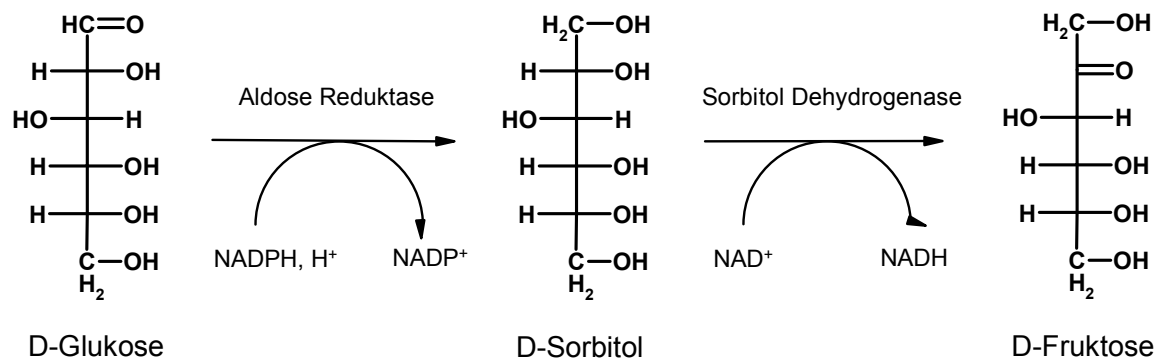


Abbildung 4. Reaktionen des Sorbitol-Stoffwechselweges. Glukose, Sorbitol und Fruktose sind in der Fischer-Projektion dargestellt.

Eine erhöhte Glukosekonzentration führt zu einem vermehrten Fluss durch den Sorbitol-Stoffwechselweg und damit zur verstärkten Bildung des stark polaren Abbauproduktes Sorbitol. Dieses lässt sich nur schwer durch die Zellmembran transportieren und reichert sich somit in den Zellen an, auch weil seine weitere Umsetzung zu Fruktose wesentlich langsamer erfolgt als seine Neubildung. Akkumuliertes Sorbitol bedingt eine Wasseraufnahme in die Zellen und damit einen erhöhten osmotischen Druck. Lange ging man davon aus, dass dies die molekulare Ursache der klinisch beobachteten diabetischen Spätschäden sei. Mittlerweile weiß man, dass auch unter diabetischen Bedingungen keine intrazellulären Sorbitol-Konzentrationen auftreten, die eine solche Annahme rechtfertigen. Heute nimmt man an, dass der vermehrte Verbrauch von NADPH unter diabetischen Bedingungen dazu führt, dass Enzyme (wie z.B. Glutathion-Reduktase), die für den Abbau von oxidativem Stress verantwortlich sind, nicht mehr effizient arbeiten können (s. Abbildung 5). Die Entstehung reaktiver Sauerstoff-Spezies (*Superoxide*) gilt dabei als Verknüpfungspunkt der verschiedenen Mechanismen zur Entstehung von diabetischen Spätkomplikationen (Brownlee 2001).

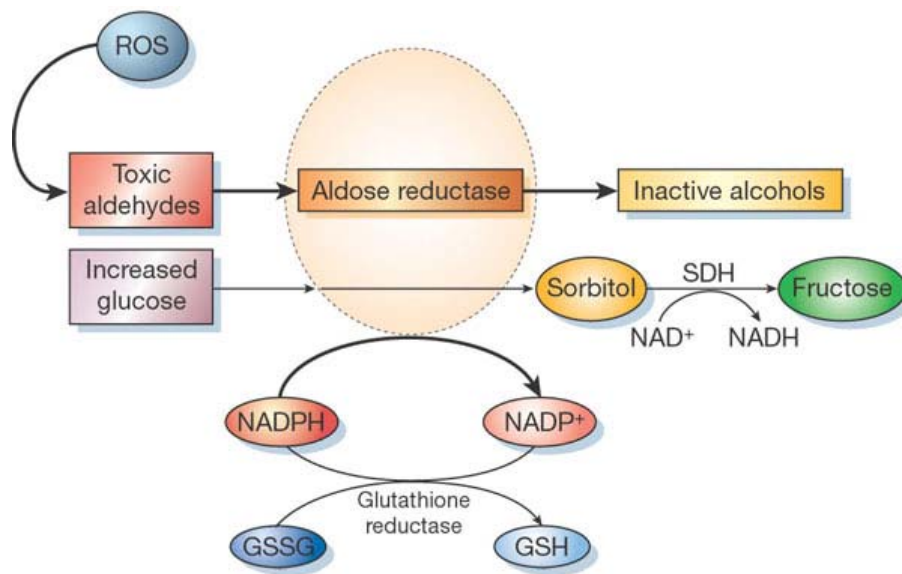


Abbildung 5. Neben Glukose reduziert Aldose Reduktase toxische Aldehyde, die aus reaktiven Sauerstoff-Spezies (ROS) entstehen, zu inaktiven Alkoholen. Als Kofaktor dient NADPH. In Zellen mit erhöhter AR-Aktivität wird die Konzentration von reduziertem Glutathion verringert, was zu einem erhöhten oxidativen Stress führt. Entnommen aus (Brownlee 2001).

Schon früh wurde erkannt, dass über eine Regulation der Enzymaktivität der Aldose Reduktase der schädigende Einfluss durch die vermehrte Entstehung von Sorbitol reduziert werden kann. Daher wird Verbindungen, die die Funktion von Aldose Reduktase hemmen können, ein Potential zur Prävention der Spätfolgen von Diabetes mellitus zugewiesen (Yabe-Nishimura 1998). Sie stellen somit einen Therapieansatz dar, der unabhängig von der insulinbeeinflussten Kontrolle des Blutzuckerspiegels ist.

3 Stand der Kenntnisse

3.1 Aldose Reduktase

Das Enzym Aldose Reduktase (EC 1.1.1.21, AKR1B1, ALR2 oder AR) wurde zuerst 1960 von Hers beschrieben und ist seitdem sehr gut charakterisiert worden. Aldose Reduktase ist ein cytoplasmisches, monomeres Enzym mit einem Molekulargewicht von ~ 35.900 D. Es ist Mitglied der Aldo-Keto-Reduktase Familie und besitzt ein Triose-Phosphat-Isomerase Strukturmotiv. Das Enzym verwendet bevorzugt NADPH als Hydrid-Donor zur Katalyse der vorwärtsgerichteten Reaktion, bei der ein Aldehyd-Substrat zu dem entsprechenden Alkohol reduziert wird. Aldose Reduktase vermag eine breite Palette von aromatischen und aliphatischen Aldehyden einschließlich Glukose und Galaktose als Substrat umzusetzen. Das natürliche Substrat der Aldose Reduktase ist bis heute unbekannt. Die breite Substratpromiskuität der Aldose Reduktase hängt vermutlich mit der Anpassungsfähigkeit des Enzyms (*induced-fit*) an verschiedene Substrate und Liganden (s. nächstes Kapitel) zusammen.

Das strukturelle und mechanistische Verständnis der Funktion und Inhibition der Aldose Reduktase wurde durch die Aufklärung der Kristallstruktur im Jahre 1992 deutlich vorangebracht. Es gelang zunächst die Struktur des Apoenzyms (aus Linsen des Schweineauges) in Abwesenheit des Kofaktors NADPH in seiner „offenen“ Form zu kristallisieren (Rondeau et al. 1992). Im gleichen Jahr wurde die Struktur des humanen Holoenzym mit gebundenem Kofaktor bekannt (Wilson et al. 1992).

Das Enzym besitzt eine α/β -TIM-barrel Faltung (s. Abbildung 6). Acht α -Helices (farbige Bänder) umschließen einen Kern von acht parallel angeordneten β -Faltblättern (farbige Pfeile). Der durch Pfeile symbolisierte Verlauf der β -Faltblätter zeigt vom N- zum C-Terminus. Das aktive Zentrum befindet sich am C-Terminus und ist von drei Schleifen begrenzt. Der Kofaktor NADPH bindet nahe dem C-Terminus, wobei der Nicotinamid-Teil im Zentrum der fassartigen Struktur zu liegen kommt. Er begrenzt auf der einen Seite das aktive Zentrum. Es schließt sich eine elliptische Bindetasche aus 7 aromatischen, 4 unpolaren und 3 polaren Aminosäureresten an.



Abbildung 6. TIM-barrel Struktur der Aldose Reduktase. Acht α -Helices (farbige Bänder) umgeben einen Kern von β -Faltblättern (farbige Pfeile). Schleifen sind in Form von farbigen Kabeln dargestellt. Der Kofaktor NADPH ist mit seiner Solvens-zugänglichen Oberfläche abgebildet. Diese ist entsprechend der Atomtypen im Molekül koloriert.

Tabelle 1. Vorkommen der Aldose Reduktase in verschiedenen menschlichen Gewebearten (Angaben entnommen aus (Oates 2002)).

Gewebeart	Konzentration [$\mu\text{g}/\text{mg}$]
Inneres Nierenmark	29
Ichiasnerv	5
Linse	3
Hoden	2
Herz	2
Augen-Hornhaut	1
Leber, Nierenrinde, Magen, Milz, Lunge, Darm	0,8-0,4

Bei der Suche nach der physiologischen Aufgabe der Aldose Reduktase hilft die Betrachtung der Verteilung von Aldose Reduktase auf verschiedene Gewebe (Tabelle 1) nur bedingt weiter. Auffällig ist die hohe Konzentration der Aldose Reduktase im inneren Nierenmark. Hier trägt die Aldose Reduktase durch Produktion von intrazellulärem Sorbitol zum Ausgleich von lokal erhöhten osmotischen Drücken im Interstitium bei. Da die SDH in diesem Gewebe nur in geringem Maße vorkommt, handelt es sich nicht um eine gemeinsame physiologische Funktion der AR und der SDH als Sorbitol-Stoffwechsel-Enzyme.

Die natürliche Funktion des Sorbitol-Stoffwechselweges ist bis heute nicht abschließend geklärt. Vermutet wird eine Funktion bei der „Feinabstimmung“ der cytosolischen Osmolarität, um kleinere osmotische Veränderungen in der Zellumgebung auszugleichen. Auch eine fundamentale Rolle als Schalter, der Glukose bei hohen Konzentrationen einer anderen Verwendung als der Glycolyse zuführt, wird diskutiert. Eine besondere Rolle spielt der Sorbitol-Stoffwechselweg in den Samenblasen. Da die Biosynthese der beiden Enzyme AR und SDH dort unter der Kontrolle von Testosteron steht, erlaubt die Bestimmung der Fruktosekonzentration in der Spermaflüssigkeit Rückschlüsse auf die Testosteronproduktion der Hoden (Löffler et al. 2003).

Weitere mögliche Funktionen der Aldose Reduktase selbst sind der Steroid-Metabolismus und die Entgiftung reaktiver Aldehyde oder deren glutathionierter Derivate. Die Zuordnung bleibt allerdings zweifelhaft, da die breite Substratspezifität der Aldose Reduktase mit der von verwandten Enzymen, wie der Aldehyd Reduktase oder der Aldehyd Dehydrogenase, überlappt.

3.2 Kristallstrukturen

Vor kurzem konnte die Struktur der hAR im Komplex mit dem Inhibitor IDD594 aufgeklärt werden. Für diesen Komplex konnten Kristalle erhalten werden, die bis zu Beugungswinkeln, die einer Auflösung von 0,66 Å entsprechen, gestreut haben. Das ist die höchste Auflösung, die bislang für einen Protein-Ligand-Komplex dieser Größe erreicht werden konnte. Diese außergewöhnlich gute Auflösung gibt neue Einblicke in die Bindetasche des Enzyms. Da die meisten Wasserstoffatome der Aminosäuren im aktiven Zentrum der Elektronendichte zugeordnet werden konnten, war es möglich, exakte Informationen über den Protonierungszustand des Inhibitors und des Proteins zu erhalten (Abbildung 7).

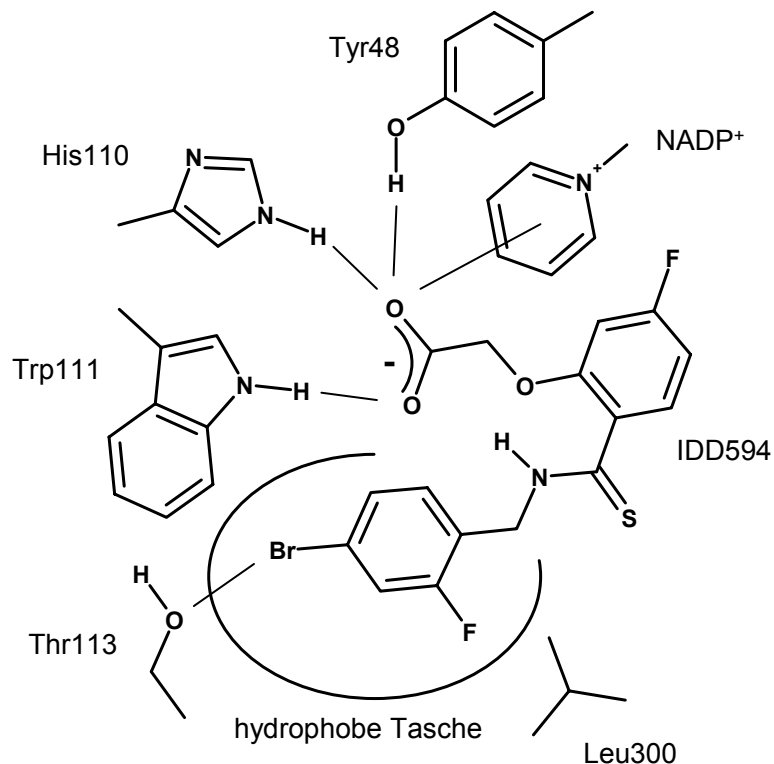


Abbildung 7. Schematische Darstellung des Bindungsmodus von IDD594 an hAR. Aus Platzgründen ist nur ein Teil des Kofaktors NADP⁺ dargestellt.

Danach bindet der Inhibitor mit seiner deprotonierten Carboxylatgruppe in einer Weise an das Protein, wie man sich den Bindungsmodus der zu reduzierenden Carbonylgruppe des Substrats im katalytischen Zentrum vorstellt. Einer der Carboxylat-Sauerstoffe bildet mit Tyr48 und N_{ε2} des neutralen His110 jeweils eine Wasserstoffbrücke, wobei der Carboxylat-Kohlenstoff in Nachbarschaft zu C4 des Nicotinamids zu liegen kommt. Der andere Carboxylat-Sauerstoff bildet eine Wasserstoffbrücke mit N_{ε1} von Trp111. Des Weiteren

befindet sich dieser Sauerstoff in Wasserstoffbrücken-Distanz zum Stickstoff des IDD594, was auf eine intramolekulare Wasserstoffbrücken-Bindung hinweist. Die drei für die Katalyse wichtigen Reste Tyr48, His110 und Trp111 (Urzhumtsev et al. 1997; Wilson et al. 1993) bilden zusammen mit NADP⁺ die polare „Anionen-Bindetasche“.

Der unpolare Teil des Inhibitors besetzt einen hydrophoben Teil der Bindetasche, der für die Spezifität des Inhibitors maßgebend ist, wobei der 4-Brom-2-fluor-benzyl-Rest zwischen Trp111 und Leu300 platziert wird.

Mittlerweile sind eine ganze Reihe von Strukturen der Aldose Reduktase im Komplex mit verschiedenen Liganden bekannt (s. Tabelle 2). Neben Strukturbestimmungen am Apo- und Holoenzym sind Komplexe der Aldose Reduktase mit Citrat, Cacodylat, Glukose-6-phosphat in der PDB hinterlegt. Aus der Reihe der Inhibitoren von Carbonsäure-Typ konnten neben IDD594 auch die Strukturen mit Tolrestat, Zopolrestat, Zenarestat, Alrestatin und IDD384 aufgeklärt werden. Aus der Reihe der Spirohydantoine wurden die Strukturen mit Sorbinil und Fidarestat bestimmt. Diese Inhibitoren binden mit ihrer basischen Gruppe in den Bereich, der bei den Inhibitoren vom Carbonsäure-Typ durch die Carboxylat-Gruppe besetzt wird. Während die IDD594-Struktur gezeigt hat, dass Hemmstoffe vom Carbonsäuretyp deprotoniert binden, ist für die Hydantoine der Protonierungs-/Tautomerie-Zustand in der Enzymtasche nicht endgültig geklärt.

Die verschiedenen Komplexstrukturen verweisen auf konformative Änderungen in der Bindetasche des Enzyms (*induced-fit*). Während alle Inhibitoren mit ihrem polaren Molekülteil das aktive Zentrum (die Anionen-Bindetasche) belegen, führt die Bindung spezifischer Inhibitoren zur Öffnung und geometrischen Adaption der Bindetasche auf den unpolaren Teil der Inhibitoren. Sie binden mit ihrem unpolaren Molekülteil in eine im Holoenzym nicht ausgebildete Spezifitätstasche, die durch Trp111, Thr113, Phe122, Ala299 und Leu300 abgegrenzt wird. Die essentielle Bedeutung von Trp111 und Thr113 für die Ligand-Bindung wurde durch Mutagenese- und *Modeling*-Studien belegt. Da die Aminosäuren der Spezifitätstasche nicht konserviert sind zwischen Aldose und Aldehyd Reduktase, sind sie ein Schlüssel zur Entwicklung von Inhibitoren mit verminderten Nebenwirkungen. Überlagert man die Komplexstrukturen, so wird deutlich, dass z.B. Sorbinil einen deutlich anderen Bereich der Bindetasche belegt als Tolrestat oder IDD594 (s. Abbildung 8). Allerdings treten auch für die beiden letzteren Inhibitoren Unterschiede im Bindungsmodus des unpolaren aromatischen Molekülteils auf (s. Abbildung 9). Ein ausführlicher Vergleich der verschiedenen Kristallstrukturen findet sich in Kapitel 4.1.

Tabelle 2. Vergleich der Bindetaschen verschiedener AR-Kristallstrukturen mit dem IDD594-Komplex als Referenz. Alle Messungen wurden nach der Überlagerung (*least-squares fit*) der C $_{\alpha}$ -Atome der Aminosäuren in der Bindetasche auf die Referenzstruktur durchgeführt. Die fünfte Spalte gibt die Anzahl der Mutationen innerhalb der Bindetasche bezogen auf das humane Enzym an. Die sechste Spalte zeigt die rms-Abweichungen der C $_{\alpha}$ -Positionen der Aminosäuren in der Bindetasche. In der siebten Spalte ist die Anzahl der C $_{\alpha}$ -Atome angegeben, deren Position um mehr als ≥ 0.9 Å von der Referenz abweicht, während die darauffolgende Spalte die Anzahl der um mehr als ≥ 1.0 Å verschobenen Seitenketten-Schwerpunkte enthält. Die Anzahl der Überschneidungen zwischen den Atomen des Referenzliganden und den Atomen der überlagerten Bindetaschen findet sich in der letzten Spalte. Als Überschneidung gilt ein Abstand, der kleiner als die Summe der vdW-Radien ist.

PDB-Code	Aufl.	Quelle	Ligand	Anzahl Mutat.	rmsd [Å]	C $_{\alpha}$	Seitenketten	Überschneidungen
1ads	1.6	human*	- (holo)	-	0.7	3	4	9
1ef3	2.8	human *	Fidarestat	-	0.7	1	4	8
1el3	1.7	human *	IDD384	-	0.6	1	3	8
1mar	1.8	human *	Zopolrestat	-	0.4	-	***	***
1iei	2.5	human *	Zenarestat	-	0.7	1	4	3
2acq	1.8	human *	Glukose-6-P	-	0.7	3	4	10
2acr	1.8	human *	Cacodylat	-	0.7	3	4	9
2acs	1.8	human *	Citrat	-	0.7	3	4	9
1dla	3.0	Schwein	- (apo)	1	3.3	19	*	*
1ah4	2.0	Schwein	- (holo)	1	0.6	2	4	10
1ah0	2.3	Schwein	Sorbinil	1	0.7	2	4	12
1ah3	2.3	Schwein	Tolrestat	1	0.7	7	7	11
1eko	2.2	Schwein	IDD384	1	0.7	4	5	11
1abn [#]	2.4	C298S**	- (holo)	3	0.6	1	***	***
2acu	1.8	Y48H**	Citrat	1	0.7	3	4	10
1az1	1.8	C298A/ W219Y**	Alrestatin	2	0.7	4	5	8
1az2	2.9	C298S/ W219Y**	Citrat	2	0.7	3	4	8

* rekombinant, ** Mutanten, *** Nur C $_{\alpha}$ -Positionen in der PDB abgelegt, [#] Pro218 und Trp219 fehlen in der Sequenz.

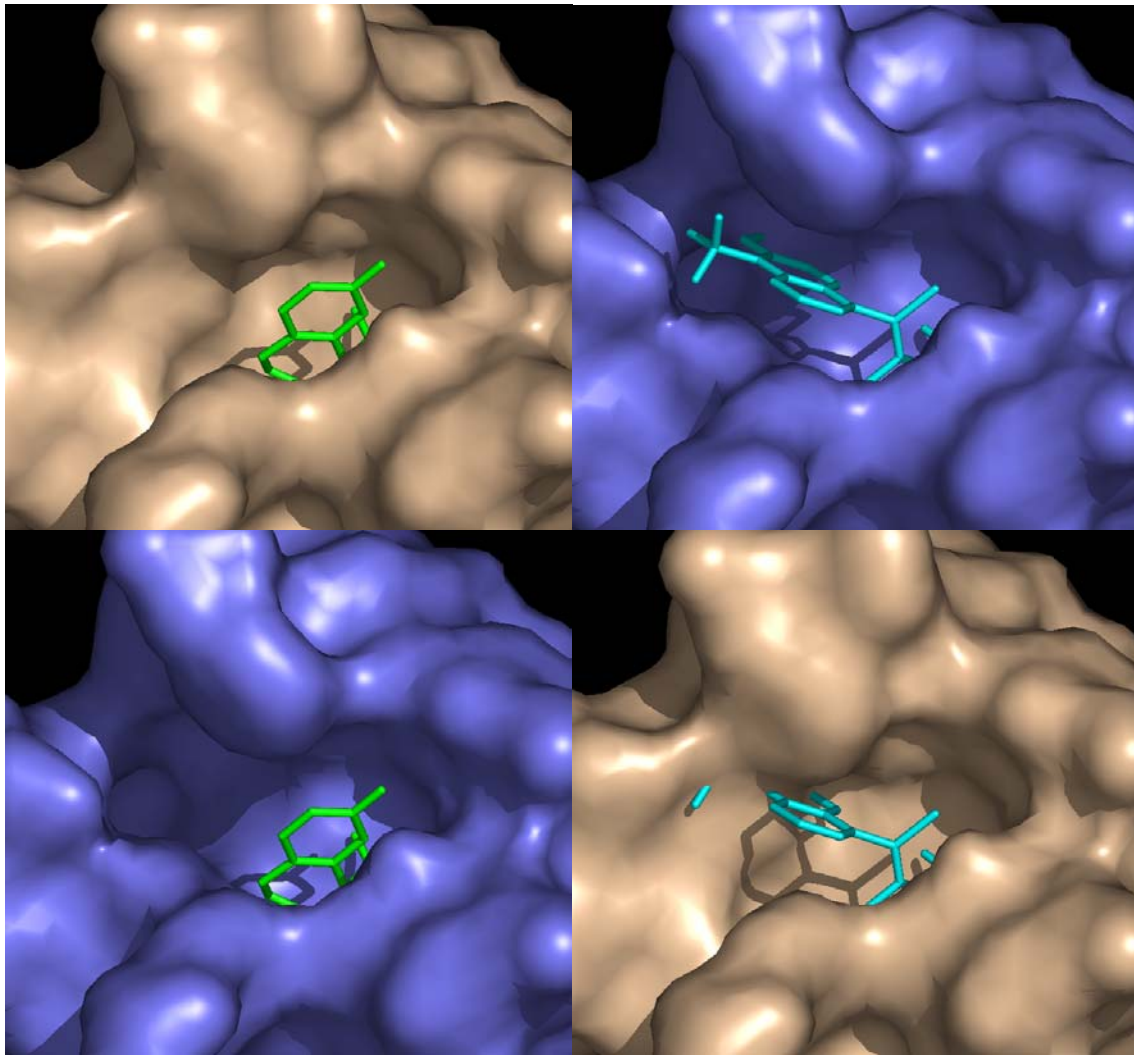


Abbildung 8. Obere Reihe: Kristallstrukturen der Komplexe der Aldose Reduktase mit Sorbinil (links, grün) und Tolrestat (rechts, cyan). Die Oberflächen wurden um den Komplex mit Sorbinil (links, beige) und Tolrestat (rechts, blau) berechnet. Untere Reihe: Nach Überlagerung der beiden Strukturen sind die Inhibitoren in der Bindetasche des Proteins mit der jeweils anderen Konformation dargestellt. Die Bindetaschen in der Nachbarschaft um die Hydantoin- bzw. Carboxylat-Gruppe nehmen weitgehend identische Form an, dagegen besitzen sie im Bereich der hydrophoben Seitenketten, bedingt durch die induzierte Anpassung, völlig verschiedene Passformen. Der größere Rest im Tolrestat stößt eine zusätzliche (Spezifitäts-)Tasche auf (oben rechts), die im Falle von Sorbinil nicht in Erscheinung tritt.

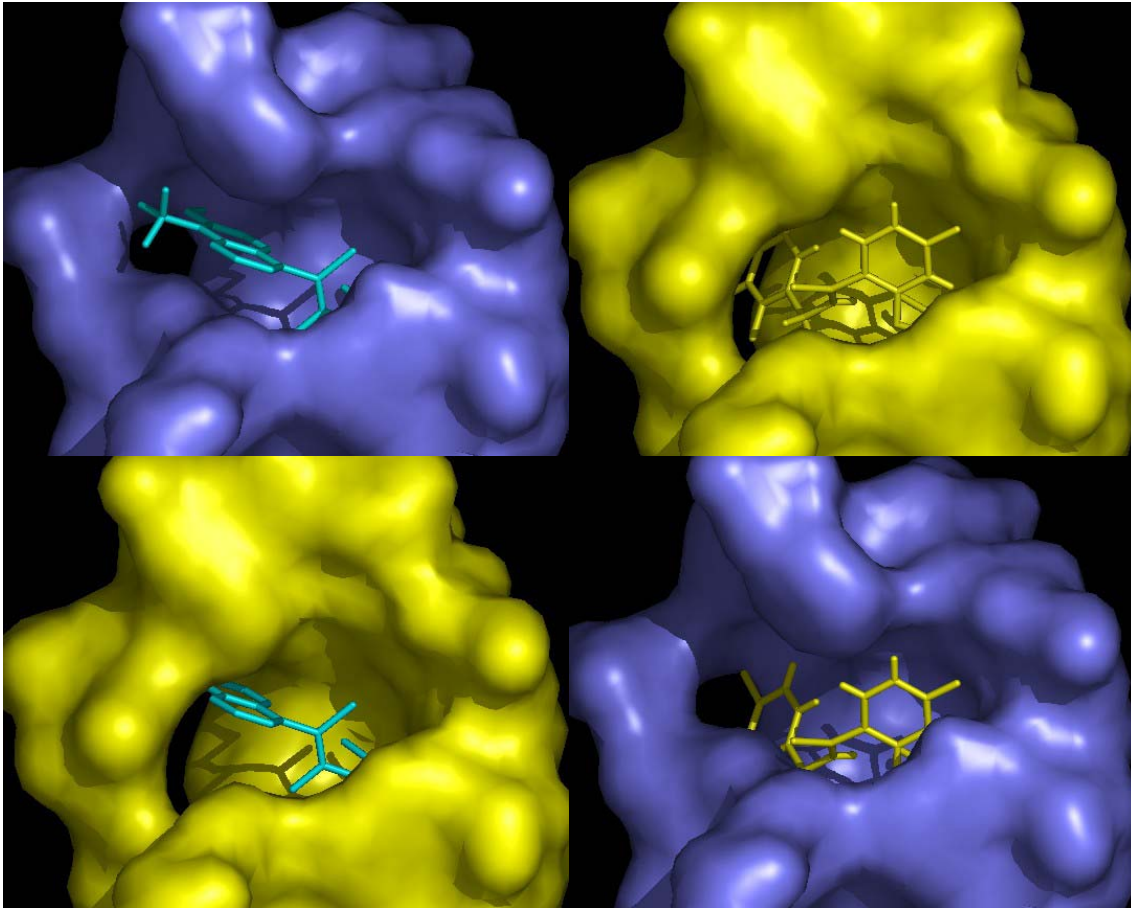


Abbildung 9. Obere Reihe: Kristallstrukturen der Komplexe der Aldose Reduktase mit Tolrestat (links, cyan) und IDD594 (rechts, gelb). Die Oberflächen wurden um den Komplex mit Tolrestat (links, blau) und IDD594 (rechts, gelb) berechnet. Untere Reihe: Nach Überlagerung der beiden Strukturen sind die Inhibitoren in der Bindetasche des Proteins mit der jeweils anderen Konformation dargestellt. Die Bindetaschen in der Nachbarschaft um die Carboxylat-Gruppen besitzen weitgehend identische Form, dagegen ergeben sich für die Taschen im Bereich der hydrophoben Seitenketten (Spezifitätstasche), bedingt durch die induzierte Anpassung, deutlich unterschiedliche Passformen. Im Vergleich zum Tolrestat ist die Tasche um die 4-Brom-2-fluorbenzyl-Gruppe des IDD594 tiefer, dafür fehlt eine Ausbuchtung, die durch die CF_3 -Gruppe am Tolrestat bedingt wird.

3.3 Inhibitoren der Aldose Reduktase

Mittlerweile ist eine ganze Reihe strukturell diverser Aldose Reduktase Inhibitoren (ARIs) bekannt (Miyamoto 2002). Tabelle 3 gibt einen Überblick. Diese Verbindungen können in zwei Substanzklassen unterteilt werden: (1) Zum einen die große Gruppe von Hemmstoffen, denen allen eine Carbonsäure-Gruppe gemeinsam ist, (2) zum anderen die Gruppe der zyklischen Imide, meist vertreten durch Spirohydantoine oder verwandte Ringsysteme. Darüber hinaus sind noch Flavonoide wie das Quercetin-Derivat (15) und Phenylsulfonylnitromethan-Derivate (16) als Hemmstoffe der Aldose Reduktase bekannt.

3.3.1 Zyklische Imide

Seit der Entdeckung von Sorbinil (8) durch Pfizer im Jahre 1978 wurden weitere Inhibitoren mit einer Spirohydantoin-Gruppe oder einem ähnlichem Gerüst entwickelt. Die Aktivität von Sorbinil ist fast ausschließlich auf das C4-S-Enantiomer zurückzuführen, wie Struktur-Wirkungsbeziehungen und eine theoretische Studie mit AS-3201 (9) zeigen konnten (Kurono et al. 2001). Die Anwendung von Sorbinil scheiterte an hypersensiblen Reaktionen, verursacht durch ein toxisches Zwischenprodukt, das beim Metabolismus von Sorbinil entsteht. Weitere Vertreter dieser Strukturklasse befinden sich aber noch in klinischen Studien: Fidarestat (10) befindet sich in Phase III (Japan) bzw. Phase II (USA), Minalrestat (11) befindet sich ebenfalls in Phase III (USA).

Nicht nur Spirohydantoine sondern auch einfache Imide und deren Bioisostere inhibieren Aldose Reduktase. Ein Beispiel für solche Bioisostere sind 2,4-Thiazolidindione (Glitazone) wie z.B. Risarestat (12). Diese Verbindungen inhibieren nicht nur Aldose Reduktase, sondern besitzen auch eine antihyperglykämische Wirkung, da sie auf PPAR γ (*peroxisome proliferator-activated receptor γ*) wirken und die Empfindlichkeit gegenüber Insulin steigern (Oliver et al. 2001; Willson et al. 2001). Sie befinden sich als „Insulin-Sensitizer“ auch auf dem deutschen Markt (Pioglitazon, Actos[®]; Rosiglitazon, Avandia[®]).

3.3.2 Carbonsäuren

Einige Aldehyd-Substrate (z.B. Glykoaldehyd) zeigen einen hemmenden Effekt auf Aldose Reduktase. Durch Ersatz der Aldehyd-Funktion mit einer Carbonsäure-Gruppe gelangte man zu potenten Inhibitoren, da diese Verbindungen nicht mehr von Aldose Reduktase reduziert werden können. Als eine der ersten Verbindungen mit hemmender Wirkung war

Tetramethylglutarsäure (1) aufgefallen. Das schlechte Membran-Penetrationsverhalten dieser Verbindung führte zur Entwicklung von Alrestatin (2). Obwohl seit 20 Jahren eine Reihe von Verbindungen in klinischen Studien an Diabetes-Patienten getestet wurden, fehlt bei den meisten Verbindungen immer noch der Beweis einer ausreichenden Wirksamkeit. Tolrestat (3), untersucht seit 1989, wurde aufgrund fehlender *in vivo*-Wirkstärke 1996 zurückgezogen. Zu den später entwickelten Inhibitoren, die klinischen Studien unterzogen wurden, gehören Ponalrestat (4), Zopolrestat (5) und Zenarestat (6). Zopolrestat wurde 1999 von klinischen Studien zur Behandlung von Neuropathien zurückgezogen, wird allerdings immer noch zur Behandlung von Cardiomyopathien und Nephropathien getestet. Zenarestat wurde 2001 aus Phase III der klinischen Studien aufgrund nicht akzeptabler toxischer Nebenwirkungen zurückgezogen. Zur Zeit ist nur Epalrestat (7), das von Ono entwickelt und 1992 auf den japanischen Markt gebracht wurde, erhältlich. Epalrestat (7) leitet sich von einem 2-Thioxo-4-thiazolidinon- oder Rhodanin-Gerüst ab.

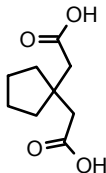
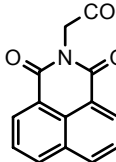
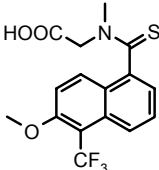
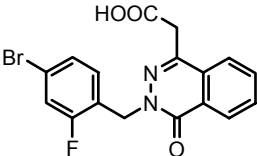
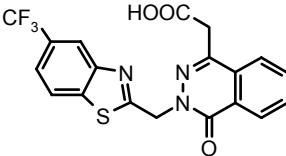
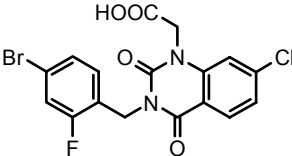
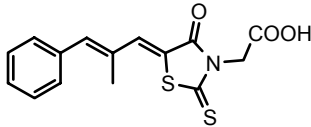
Toxische Nebenwirkungen sind vermutlich auf Wechselwirkungen mit anderen Enzymen zurückzuführen. Um dies zu vermeiden, bedarf es einer gesteigerten Spezifität der Inhibitoren. Als Maß für die Spezifität von ARIs hat sich der Vergleich der Inhibitor-Affinitäten zu Aldose Reduktase (ALR2) und zu dem verwandten Enzym Aldehyd Reduktase (ALR1), das ebenfalls zur Familie der Aldo-Keto-Reduktasen gehört und 60% Sequenzidentität aufweist, etabliert.

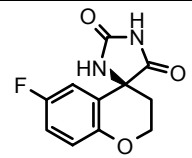
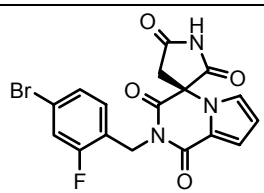
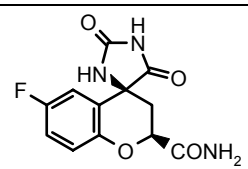
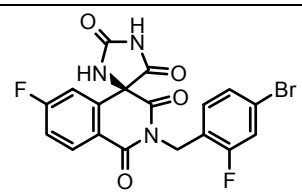
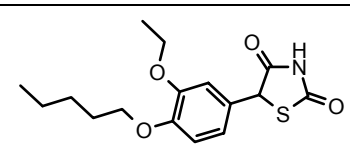
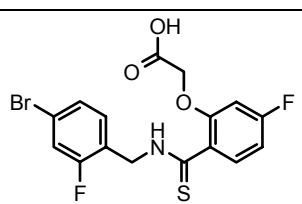
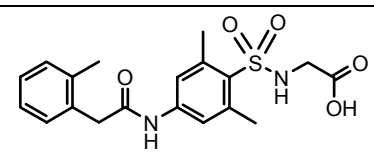
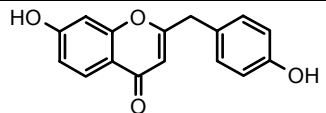
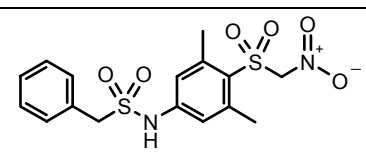
Ebenfalls kritisch für den Erfolg eines Inhibitors ist sein pharmakokinetisches Verhalten. Während Carbonsäuren und zyklische Imide vergleichbare *in vitro* Aktivitäten aufweisen, zeigen Letztere in der Regel eine höhere *in vivo* Aktivität. Carbonsäuren liegen aufgrund ihrer niedrigen pK_A -Werte bei physiologischem pH deprotoniert vor, wodurch die Aufnahme über biologische Membranen erschwert wird. Der stark hydrophobe Charakter der AR-Spezifitätstasche spiegelt sich in den meist aus mehreren Aromaten aufgebauten Grundgerüsten der bekannten Inhibitoren wider. Dies führt zumeist zu einer schlechteren Wasserlöslichkeit, ein weiterer wichtiger Parameter, der für optimale ADME-Eigenschaften der Inhibitoren angepasst werden muss. Vom *Institute for Diabetes Discovery* (IDD) stammen Phenoxyessigsäure-Derivate wie IDD594. Diese Verbindungen zeigen neben einer verbesserten Löslichkeit eine hohe Selektivität für Aldose Reduktase gegenüber Aldehyd Reduktase. Ebenfalls von diesem Institut entwickelt wurde IDD384. Dieser Inhibitor gehört zu den Benzoylaminophenylsulfonylglycinen, die als Bioisostere der bereits erwähnten Phenylsulfonylnitromethane angesehen werden können.

Nachdem in den letzten Jahren einige Komplexstrukturen röntgenkristallographisch bestimmt werden konnten (s. Kapitel 3.2), wurden vermehrt Methoden des Struktur basierenden

Wirkstoffdesigns zur Identifizierung und Entwicklung weiterer Inhibitoren eingesetzt (s. Kapitel 3.5).

Tabelle 3. Eine Auswahl bekannter Aldose Reduktase Inhibitoren. In den ersten Spalten sind der Name der Verbindung und die Strukturformel angegeben. Die dritte Spalte listet die für die jeweilige Verbindung bestimmten IC₅₀-Werte auf, die vierte Spalte verweist auf die entsprechende Literatur. Die letzte Spalte enthält (falls vorhanden) den PDB-Code der zugehörigen Kristallstruktur.

Nr.	Trivialname	Strukturformel	IC ₅₀ [μM]	PDB	Literatur
1	-		-	-	(Kinoshita 1974)
2	Alrestatin		15	1az1	(Dvornik et al. 1973)
3	Tolrestat		0,03–0,1	1ah3	(Sestanj et al. 1984)
4	Ponalrestat (ICI 128,436)		0,007-0,11	-	(Stribling et al. 1985)
5	Zopolrestat		0,003-0,04	1mar	(Mylari et al. 1991)
6	Zenarestat		0,04-0,06	1iei	(Tanaka et al. 1993)
7	Epalrestat (ONO-2235)		0,01-15	-	(Terashima et al. 1984)

8	Sorbinil		0,15-3,5	1ah0	(Sarges et al. 1986)
9	AS-3201		0,15	-	(Negoro et al. 1998)
10	Fidarestat (SNK860)		0,009-0,02	1ef3	(Mizuno et al. 1992)
11	Minalrestat		k.A.	-	(Malamas et al. 1994)
12	Risarestat (CT112)		k.A.	-	(Sohda et al. 1982)
13	IDD594		0,03	-	(Van Zandt et al. 1999)
14	IDD384		k.A.	1eko, 1el3	(Kompella et al. 1999)
15	-		2,5	-	(Costantino et al. 1999)
16	-		k.A.	-	k.A.

3.4 Untersuchungen zum Mechanismus

Wie bereits erwähnt, katalysiert Aldose Reduktase die Reduktion einer Vielzahl von Aldehyd-Substraten zu den entsprechenden Alkoholen. In der Reduktionsreaktion wird ein Hydridion vom C4-Atom des Nicotinamid-Rings des Kofaktors NADPH auf den Carbonylkohlenstoff des Substrataldehyds übertragen. Um die Reduktion zum Alkohol abzuschließen, muss weiterhin ein Proton von einer der Aminosäuren im aktiven Zentrum auf das Substrat übertragen werden. Die Frage, welche Aminosäure dabei als Protonendonator fungiert und in welcher Reihenfolge Hydrid und Proton übertragen werden, wurde lange kontrovers diskutiert.

Zur Klärung dieser Frage wurden neben kristallographischen Untersuchungen eine Reihe von Mutanten hergestellt. Tabelle 4 gibt einen Überblick über diese Mutationsstudien und fasst die Ergebnisse qualitativ zusammen. Kristallstrukturen mit der C298S- und der Y48H-Mutante, sowie mit der C298A/W219Y-Doppelmutante, konnten aufgeklärt werden (s. Tabelle 2) und zeigen, dass die Strukturen im Vergleich zum Wildtyp, über das gesamte Enzym betrachtet, nahezu unverändert sind. Dies wird bestätigt durch Untersuchungen an anderen Mutanten mittels Zirkular-Dichroismus (Bohren et al. 1994; Carper et al. 1995).

Seit der Bestimmung der 3-dimensionalen Struktur der Aldose Reduktase wurden einige Molecular Modeling Studien durchgeführt, die Einblick in den Bindungsmodus der Inhibitoren und deren Inhibitionsmechanismus geben. Eine Studie von Itzstein et al. (De Winter et al. 1995) hat gezeigt, dass Tyr48, His110 und Trp111 Wasserstoffbrücken mit den Substraten D-Xylose, L-Xylose und D-Lyxose ausbilden. Eine gute Korrelation zwischen berechneten Enthalpien und experimentell bestimmten $\log(K_m)$ - oder $\log(k_{cat}/K_m)$ - Werten konnte nur erhalten werden, indem das N ϵ 2-Atom des His110 protoniert und das N δ 1-Atom dieses Histidins deprotoniert angenommen wurde. AMBER und DELPHI wurden zur Berechnung von Bindungsenthalpien und Solvatationsenergien verwendet. Die Substratbindung wurde auch von Kador et al. (Lee et al. 1998b) mit Hilfe einer Kombination aus Quantenmechanik (QM) und Molekularmechanik (MM) untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass die Reduktion von D-Glyceraldehyd zu Glycerol bevorzugt mit His110 und nicht mit Tyr48 als Protonendonator abläuft. Allerdings steht diese Aussage nicht im Einklang mit einer Computer-Simulation, die von Warshel et al. (Varnai et al. 2000) durchgeführt wurde. Diese Studie kommt zu der Schlussfolgerung, dass Tyr48 als Protonendonator fungiert,

während die neutrale His110-Seitengruppe wichtig für die Substratbindung während der Katalyse ist.

In Bezug auf die Reduktion von Aldehyd-Substraten sind Inhibitoren vom Carbonsäure-Typ nicht-kompetitiv, wie für den Inhibitor Alrestatin gezeigt werden konnte (Ehrig et al. 1994). Obwohl dieser Befund nicht zwangsläufig die Bindung der Inhibitoren in das aktive Zentrum des Enzyms ausschließt, führte er zu einer Diskussion über die Existenz einer zweiten, separaten Bindestelle (Kador et al. 1995). Allerdings zeigen alle Kristallstrukturen (s. Kapitel 3.2), dass die ARIs vom Carbonsäure- und Hydantoin-Typ im aktiven Zentrum binden. Eine separate Bindestelle konnte nie kristallographisch belegt werden. Zudem sind Carbonsäure-Inhibitoren kompetitiv in Bezug auf die rückwärtsgerichtete Reaktion (Griffin et al. 1986; Harrison et al. 1994; Liu et al. 1992), d.h. die Oxidation von Alkoholen zu dem entsprechenden Aldehyd, die ebenfalls von Aldose Reduktase katalysiert wird. Um dieses Verhalten zu erklären, wurde vorgeschlagen, dass geladene Inhibitoren (wie z.B. Carboxylate) zwar genau wie die Substrate in das aktive Zentrum binden, allerdings erst nachdem der katalytische Zyklus durchlaufen wurde (Ehrig, Bohren et al. 1994; Urzhumtsev, Tete-Favier et al. 1997). D.h. sie binden bevorzugt an den AR·NADP⁺-Komplex, während Substrate an die reduzierte AR·NADPH-Form binden. Dies konnte durch die in dieser Arbeit durchgeführten ITC-Studien belegt werden (s. Kapitel 4.6.3). Diese Diskriminierung zwischen NADP⁺ und NADPH ist konsistent mit der Annahme, dass His110 neutral vorliegt. Andererseits schlugen Lee et al. (Lee et al. 1998a) vor, dass der negativ geladene Inhibitor ein positiv geladenes His110 bevorzugen könnte, wodurch eine weitere Salzbrücke ausgebildet werden könnte. Wie die hochaufgelöste IDD594-Struktur nahelegt, binden Hemmstoffe vom Carbonsäuretyp deprotoniert und bilden Wasserstoffbrücken-Bindungen zu einem neutralen His110, Tyr48 und Trp111 aus. Die wesentliche elektrostatische Wechselwirkung findet also zwischen Inhibitor und NADP⁺ statt. Dazu passt die Beobachtung, dass Alrestatin auch nach Mutation von His110 zu einem neutralen Alanin immer noch an das Enzym bindet (Ehrig, Bohren et al. 1994). Die gleiche Studie hat gezeigt, dass Alrestatin nach Mutation von Tyr48 zu His nicht mehr binden kann. Die Wasserstoffbrücke über den Sauerstoff des Tyr48 ist demnach im Gegensatz zur Wasserstoffbrücke über Nε1 des His110 unverzichtbar für die Ligandbindung. Wie die IDD594-Kristallstruktur zeigt, wird die Tyr48 OH-Gruppe durch das positiv geladene Lys77 polarisiert, wodurch die Wasserstoffbrücke zusätzlich verstärkt wird. Mutation von Lys77 zu einem ungeladenen Methionin führt zu einem starken Aktivitätsverlust des Enzyms (Bohren, Grimshaw et al. 1994; Tarle et al. 1993).

Tabelle 4. Übersicht der literaturbekannten Mutationsstudien mit qualitativer Zusammenfassung der beobachteten Effekte. Literatur: (1) (Bohren et al. 1991), (2) (Tarle, Borhani et al. 1993), (3) (Bohren, Grimshaw et al. 1994), (4) (Ehrig, Bohren et al. 1994), (5) (Carper, Hohmann et al. 1995), (6) (Kubiseki et al. 1995) (7) (Singh et al. 2000) (8) (Petrash et al. 1992), (9) (El-Kabbani et al. 1999).

Mutation	Enzym	Literatur	beobachteter Effekt
Trp20Ala	human	4	Verlust der Inhibition bei Alrestatin und Sorbinil (keine Bindung). Bindung von Zopolrestat und Zenarestat weniger stark abgeschwächt. Bindung von Citrat ($IC_{50}=60\text{mM}$) wird nicht beeinflusst.
	human	7	Inhibition (durch Zopolrestat und Zenarestat) stark abgeschwächt
Trp20Tyr	human	7	Inhibition (durch Zopolrestat und Zenarestat) kaum abgeschwächt
Asp43Asn	human	2	K_M und k_{cat} kaum verändert (DL-Glyceraldehyd, pH 7)
Tyr48Phe	human	2	Enzym inaktiv
	human	3	Enzym inaktiv
	human	4	Enzym inaktiv
	Ratten-Linse	5	Enzym inaktiv
Tyr48His	human	3	Spezifitätskonstante um Faktor 10^5 reduziert (DL-Glyceraldehyd, pH 7)
	human	4	Verlust der Inhibition durch Alrestatin (keine Bindung)
Tyr48Ser	human	3	Spezifitätskonstante um Faktor 10^5 reduziert (DL-Glyceraldehyd, pH 7)
Lys77Met	human	2	spezifische Aktivität um Faktor $\sim 10^3$ reduziert
	human	3	Enzym inaktiv
His110Asp	human	2	K_M steigt, k_{cat} kaum verändert (DL-Glyceraldehyd, pH 7)
His110Gln	human	3	Spezifitätskonstante sinkt (DL-Glyceraldehyd, pH 7)

His110Gln	Ratten-Linse	5	K_M steigt um Faktor 200, k_{cat} kaum verändert (DL-Glyceraldehyd). Verminderte Inhibition (Sorbinil, Tolrestat, u.a.)
His110Ala	human	3	Spezifitätskonstante sinkt (DL-Glyceraldehyd, pH 7)
	human	4	leicht abgeschwächte Alrestatin-Bindung
Trp111Ala	human	7	Inhibition (durch Zopolrestat und Zenarestat) stark abgeschwächt
Trp111Tyr	human	7	Inhibition (durch Zopolrestat und Zenarestat) kaum abgeschwächt
His187Gln	Ratten-Linse	5	kein Einfluss auf Aktivität und Inhibition
His200Gln	Ratten-Linse	5	kein Einfluss auf Aktivität und Inhibition
Tyr209Phe	human	4	kein Einfluss auf die Alrestatin-Bindung
Pro216Ser	human	9	Schwächung der Kofaktor-Bindung
Trp219Ala	human	4	leicht abgeschwächte Alrestatin-Bindung
Lys262Met	human	1	Aktivität unverändert
Arg268Met	human	6	Aktivität unverändert
Cys298Ala	human	4	kein Einfluss auf die Alrestatin-Bindung
Cys298Ser	Ratten-Linse	5	kein Einfluss auf die Inhibition (Sorbinil, Tolrestat, u.a.)
	human	8	Sorbinil bindet schwächer (K_i 10fach erhöht), kein Einfluss auf Tolrestat-Bindung

Die erste quantenchemische Untersuchung des katalytischen Mechanismus, die die neuen Erkenntnisse aus der hochaufgelösten IDD594-Struktur berücksichtigt, stammt von Cachau et al. (Cachau et al. 2000). Die Autoren verwenden insbesondere die exakte Information über die Orientierung und den Protonierungszustand des His111. Sie führen MD-Simulationen und DFT-Rechnungen mit verschiedenen Modellen für Zwischenstufen der Substrat-Reduktion durch, um mögliche Reaktionspfade einzugrenzen. Sie kommen zu der Schlussfolgerung, dass weder His110 noch Tyr48 allein als Protonendonator fungieren. Vielmehr ist die Übertragung des Protons ein gemeinsamer Effekt der drei Aminosäuren Lys77, Tyr48 und His110. Das geladene Lys77 polarisiert die Tyr48 OH-Gruppe. Diese überträgt dann ihr Proton auf His110. Das nunmehr positiv geladene His110 schließlich überträgt ein Proton auf das

Substrat. Tyr48 ist somit die Quelle der Protonen, während His110 als Protonenüberträger fungiert.

Für die durch Aldose Reduktase katalysierte Aldehyd-Reduktion wird folgender Mechanismus postuliert (Abbildung 10).

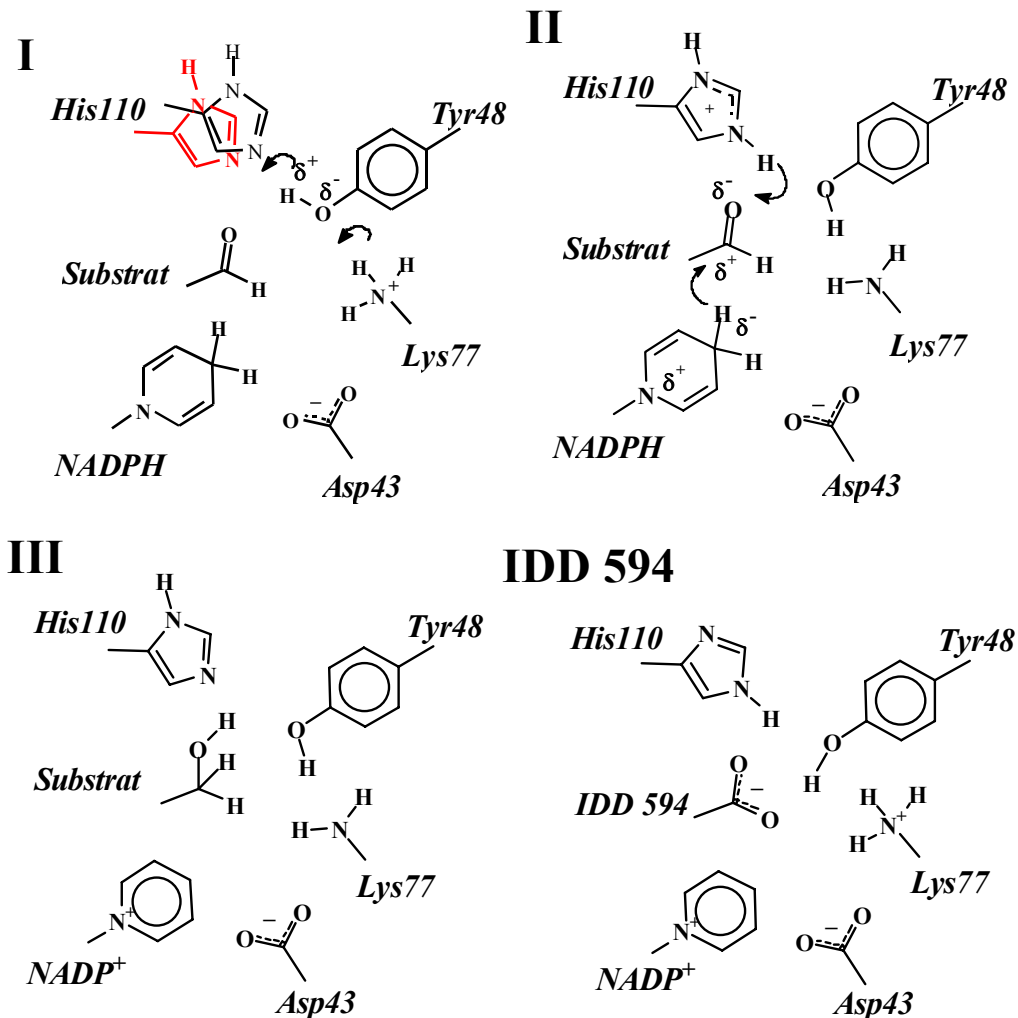


Abbildung 10. Postulierter Mechanismus der Aldose Reduktase katalysierten Reduktion von Aldehyden zu den entsprechenden Alkoholen (entnommen aus (Cachau, Howard et al. 2000)). I) In dem nativen AR-NADPH-Komplex bildet His110 (schwarz) eine Wasserstoffbrückenbindung mit Tyr48 aus und ermöglicht somit dem Proton zwischen Lys77 und dem einfach protonierten (neutralen) His110 zu wandern. II) Nach Diffusion des Substrates in das aktive Zentrum findet der Hydrid-Transfer statt, wodurch ein reaktives Alkoholat gebildet wird. Dieses Alkoholat stabilisiert das zweifach protonierte (positiv geladene) Histidin, welches auf die in der Kristallstruktur beobachtete Position verschoben wird. Abschließend findet der Proton-Transfer statt. III) Nach Abschluss der Reaktion ist die positive Ladung von Lys77 auf NADP⁺ übergegangen. **IDD594**) Die beobachtete Struktur mit der geladenen Carboxylat-Gruppe des Inhibitors ahmt die Wechselwirkung zwischen His110 und dem Alkoholat nach.

3.5 Struktur basierendes Wirkstoffdesign

Costantino et al. (Costantino et al. 1996) berichten über *Molecular Modeling* und MD Untersuchungen eines Pyridazinonessigsäure Inhibitors ($IC_{50} = 6,4 \mu M$), die auf spezifische Wechselwirkungen des Inhibitors mit Aldose Reduktase hindeuten.

Eine MD Simulation von Aldose Reduktase im Komplex mit dem Inhibitor Tolrestat wurde von Rastelli et al. (Rastelli et al. 1998a) durchgeführt. Eines der resultierenden Modelle des Komplexes stimmte gut mit der experimentell beobachteten Kristallstruktur überein.

Basierend auf den Aktivitäten einiger bekannter Aldose Reduktase Inhibitoren und deren Bindungsmoden, die in einer Docking-Studie vorhergesagt wurden, haben Kador et al. (Lee, Chen et al. 1998a) ein Pharmakophor-Modell für Aldose Reduktase abgeleitet.

Zwei Gruppen haben FEP Studien mit AMBER durchgeführt. Rastelli et al. (Rastelli et al. 1998b) untersuchten eine Serie von methoxylierten Analoga des bereits zuvor untersuchten Pyridazinon-essigsäure Inhibitors, um eine Erklärung für die beobachteten Unterschiede der Affinitäten der betrachteten Inhibitoren zu finden. Die durch Punkt-Mutationen von Aminosäuren des aktiven Zentrums verursachten Effekte wurden von Singh et al. (Singh, Malamas et al. 2000) bewertet, um ein Modell für den Bindungsmodus des Inhibitors Zopolrestat zu erhalten. Dieses Modell wurde anschließend zur Vorhersage der Bindungsmoden anderer ARIs verwendet.

Basierend auf der bereits zuvor erwähnten Modeling Studie haben Rastelli et al. (Rastelli et al. 1997) ein neues Derivat mit einer 100fach gesteigerten Affinität entwickelt. Diese Verbindung ist allerdings die simple Vereinigung des trizyklischen Pyridazinon-Gerüsts mit dem Benzothiazol-Ring des Zopolrestat.

Von Wilson et al. (Wilson et al. 1997) stammt eine der ersten Studien, bei der ARIs durch eine 3D-Datenbanksuche entdeckt wurden. Unter den 30 Verbindungen, die von DOCK am besten bewertet wurden, konnten einige aromatische Aldoxime mit Inhibitionskonstanten im mikromolaren Bereich identifiziert werden, die allerdings den bereits bekannten Benzaldoximen in Struktur und Affinität sehr ähnlich waren.

Ein erfolgreiches Beispiel für die Entdeckung neuartiger ARIs mit Hilfe einer Datenbanksuche wurde von Iwata et al. (Iwata et al. 2001) veröffentlicht. Dabei konnten sieben ARIs im mikromolaren Bereich mit einer Trefferquote von 20% identifiziert werden. Dazu wurde das Programm ADAM&EVE verwendet, um Verbindungen aus der ACD-Datenbank in die AR-Bindetasche, die der Komplexstruktur mit Glukose-6-Phosphat (PDB code 2acq) entnommen wurde, einzupassen.

Rastelli et al. (Rastelli et al. 2002b) berichten von einer Datenbanksuche bei der neben den bekannten Hemmstoffklassen auch Inhibitoren aus anderen chemischen Klassen, darunter Sulfonsäuren, Sulfonamide und Verbindungen mit einer Carbonyl- oder Nitro-Gruppe, gefunden wurden. Die Autoren verwendeten das Programm DOCK, um Moleküle aus der NCI Datenbank in eine Bindetasche einzupassen, die einem zuvor Energie minimierten Modell der Aldose Reduktase entnommen wurde. Ähnlich wie bei Iwata et al. wurde eine Trefferquote von ~20% erreicht, ohne dass dem Docking andere Selektionsschritte zum Filtern möglicher Kandidatenmoleküle vorgeschaltet wurden.

4 Ergebnisse und Diskussion

Teile dieser Arbeit wurden bereits zur Veröffentlichung eingereicht. Im folgenden werden die erzielten Arbeitsergebnisse daher in einigen Kapiteln durch den englischen Originaltext der Veröffentlichung beschrieben. Die erhaltenen Ergebnisse werden zunächst im jeweiligen Kapitel diskutiert. Kapitel 5 fasst die Ergebnisse noch einmal zusammen und gibt einen Ausblick.

4.1 Vergleichende Kristallstruktur-Analyse und MD-Simulationen¹

4.1.1 Introduction

Aldose Reductase (EC 1.1.1.21.) is an NADPH-dependent enzyme that catalyzes the reduction of various aromatic and aliphatic aldehydes (primarily aldoses) to the corresponding alcohols (Oates 2002; Yabe-Nishimura 1998). Physiologically, its role in the polyol pathway is of prime importance, where aldose reductase is responsible for the reduction of glucose to sorbitol. The processing of glucose through the polyol pathway is activated at elevated levels of glucose, a common situation in patients suffering from diabetes mellitus. Since sorbitol does not easily cross cell membranes and is only slowly converted to fructose via sorbitol dehydrogenase, it accumulates in cells with insulin-independent glucose uptake, leading to an increase in osmotic pressure and eventual cell damages. Furthermore, enhanced processing of glucose through the polyol pathway results in depletion of the NADPH reservoir which causes increased oxidative stress. A variety of diabetic complications has been attributed to these biochemical phenomena caused by glucose processing through the polyol pathway. Accordingly, aldose reductase has found considerable attention as a target for therapeutic intervention to prevent disabling complications of diabetes, resulting in the development of a large variety of inhibitors (Miyamoto 2002). So far, however, none of these has proven to be clinically useful, except for the compound epalrestat currently marketed in Japan. This underlines the need for continuing efforts to develop new aldose reductase inhibitors.

¹ Das folgende Kapitel wurde zur Veröffentlichung eingereicht: Christoph A. Sotriffer, Oliver Krämer, Gerhard Klebe, Ultra-high resolution drug design IV: Probing flexibility and "induced-fit" phenomena in aldose reductase by comparative crystal structure analysis and molecular dynamics simulations, *Proteins: Structure, Function and Genetics*.

One of the strategies to identify new ligands and to develop novel inhibitors is given by structure-based design (Klebe 2000). In this approach, the three-dimensional structure of the target enzyme is the key-component in the ligand-design and optimization process, which proceeds by iterative application of computational and experimental techniques. In the case of aldose reductase, a few studies following this strategy have already been pursued (Iwata, Arisawa et al. 2001; Krämer et al. akzeptiert; Rastelli, Ferrari et al. 2002b). They are, however, commonly hampered by the fact that aldose reductase shows pronounced induced-fit effects, resulting in different binding-site conformations for different inhibitors. As a consequence, predictions of binding modes, docking, and virtual screening are significantly complicated and often faced with unexpected results upon experimental validation.

To support future structure-based design efforts, a more comprehensive knowledge about accessible binding-site conformations seems mandatory, as it represents a prerequisite for the application of some emerging new strategies for the consideration of multiple conformations in the drug design process (Carlson 2002a; Carlson and McCammon 2000; Halperin, Ma et al. 2002). Information of this kind can - at least in part - be obtained by a careful comparison of available crystal structures. Here, such an analysis has been carried out with the aid of RELIBASE+ as a powerful data mining tool (Bergner et al. 2001; Gunther et al. 2003; Hendlich 1998; Hendlich et al. 2003). With respect to binding-site flexibility, the results are, however, necessarily limited as long as no complete coverage of all representative conformations is reached by the available experimental structures.

Accordingly, to further probe the binding site flexibility of aldose reductase, extensive molecular dynamics (MD) simulations have been carried out and are reported here. MD simulations have already been applied to aldose reductase by other research groups addressing a variety of different aspects (Costantino, Rastelli et al. 1996; Lee et al. 2003; Rastelli and Costantino 1998a; Rastelli, Ferrari et al. 2002b). Here, the main purpose is to conduct thorough conformational sampling under the most realistic simulation conditions, i.e. applying full explicit solvation, periodic boundary conditions, long-range electrostatics, no structural restraints, and multi-nanosecond sampling times. Fueled by dramatic increases in computing power and algorithmic improvements, MD simulations can nowadays be conducted under these conditions and have as such proven to be a valuable tool for studying protein dynamics (Karplus 2002; McCammon et al. 2002). The simulation studies presented here are based on the crystal structure of aldose reductase in complex with IDD594, one of the most potent inhibitors known to date (Van Zandt, Sibley et al. 1999). This structure has been solved to a resolution of 0.66 Å (Howard et al. submitted), providing unprecedented quality and detail, including information about hydrogen atom positions and thus protonation states. Using such

an ultra-high resolution structure as starting point comes as a significant advantage for MD simulations, not only because of the higher structural quality, but also because fewer assumptions must be made upon setup of the system for the simulation (e.g., histidine protonation states).

4.1.2 *Materials and Methods*

Comparisons of binding sites in aldose reductase crystal structures were carried out with RELIBASE+ (Bergner, Gunther et al. 2001; Gunther, Bergner et al. 2003; Hendlich 1998; Hendlich, Bergner et al. 2003). The IDD594 complex structure (i.e., the starting point of the MD simulations) was incorporated into an in-house version of the RELIBASE+ database for comparison with publicly available aldose reductase structures. Using the IDD594 complex as reference, all structures with a sequence identity of $\geq 85\%$ and a resolution of at least 2.5 Å were retrieved from the database. For two of the 14 structures obtained this way only the C $^{\alpha}$ coordinates are deposited in the PDB, thus leaving 12 structures for complete comparison (cf. Table 1). Eight of these structures are from human aldose reductase (with two mutants: the Cys298Ala/Trp219Tyr double mutant 1az1, and the Tyr48His mutant 2acu), the other four (1ah0, 1ah3, 1ah4, 1eko) are from the porcine enzyme. The overall sequence identity between human and porcine aldose reductase is 86.3%; close to the binding region the differences in sequence are limited to the substitutions of Phe121 by Pro and of Leu301 by Met in the porcine protein. Superposition of all 12 structures with the IDD594 complex structure was carried out using only residues of the binding site which are within 6 Å of the ligand in the reference structure. Details on the comparative measurements are given in the legend to Table 1.

All MD simulations described herein are based on the ultra-high resolution crystal structure of human aldose reductase complexed with the cofactor NADP⁺ and the inhibitor IDD594 (cf. Figure 1). Three different simulations were setup. In a first simulation, the native complexed state with both cofactor and inhibitor present was used as starting point ("native" simulation, serving as reference and denoted as "*lig_300K*"). The second simulation was started from the same structure, but the inhibitor was removed ("perturbed" simulation, denoted as "*no_lig_300K*"). The third simulation, finally, used the same inhibitor-devoid starting point as the second, but was carried out at a higher temperature ("perturbed high-temperature" simulation, denoted as "*no_lig_350K*"). Besides these differences, the setup and simulation protocol was identical in all three cases.

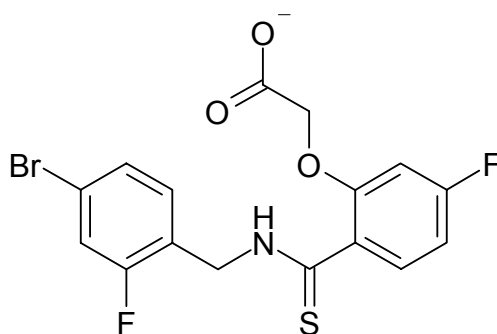


Figure 1. a) The cofactor (NADP^+ ; displayed as surface model color-coded by atom type) and the ligand (IDD594; displayed as surface model colored in yellow) are deeply buried within the compact globular fold of aldose reductase. b) Structural formula of ligand IDD594. The crystal structure of the complex shows that the compound binds with a deprotonated carboxylate to aldose reductase.

All preparing steps and simulations were carried out with the AMBER 6.0 suite of programs (Case et al. 1999), using the Cornell et al. force field (Cornell et al. 1995) in the variant of the parm99 parameter set (Wang et al. 2000). Missing force field parameters for the ligand IDD594 were derived from experimental data and by comparison with existing parameters. The same applies to the cofactor NADP⁺, where parameters generously provided by Giulio Rastelli (University of Modena, Italy) were available for comparison. Atomic charges for both ligands were calculated by fitting to the HF/6-31G* electrostatic potential using the conformation observed in the crystal structure. The corresponding ab initio calculations were performed with GAUSSIAN98 (Frisch et al. 1998), the restrained electrostatic potential fit with the RESP program (Bayly et al. 1993; Cornell et al. 1993). Hydrogen atoms were used as assigned by the crystallographers, whereby, due to the high resolution, 54% of all possible hydrogen atoms in the protein were experimentally observed (77% of the hydrogens in the binding site). The simulated protein system thus consisted of 316 amino acids or 5071 atoms, plus the cofactor with 73 atoms and the ligand with 35 atoms.

In all three cases, the starting structure (i.e., the inhibitor complex in the native simulation and the corresponding structure without inhibitor in the perturbed simulations) was subjected to a short initial energy minimization in vacuo using 20 steps of steepest descent followed by 180 steps conjugate gradient minimization. After addition of counterions to ensure neutrality, the systems were solvated in a box of TIP3P water molecules (Jorgensen et al. 1983), which resulted in box sizes of $\sim 81 \text{ \AA} \times 66 \text{ \AA} \times 77 \text{ \AA}$ and a total of ~ 9100 water molecules. Subsequently, 20 steps steepest descent and 180 steps conjugate gradient minimization were applied to water molecules and counterions of the solvated system. The MD simulation was then started by heating the solvent to 300K over a period of 20 ps and cooling to 100 K over a period of 5 ps, keeping the protein (and ligands) fixed. After this, the entire system was gradually brought to 300 K (350 K in case of the high-temperature perturbed simulation) over a period of 25 ps. The simulation was then carried on under NPT and periodic boundary conditions for 3050 ps.

The temperature was kept constant by coupling to a heat bath through the Berendsen algorithm (Berendsen et al. 1984). Pressure was adjusted by isotropic position scaling using a Berendsen-like algorithm. Covalent bonds to hydrogens atoms were constrained by the SHAKE algorithm (Ryckaert et al. 1977) and a time step of 2 fs was used. A cutoff of 9 Å was applied to the van der Waals interactions, while the electrostatics were treated by the Particle Mesh Ewald method (Darden et al. 1993). The simulation was carried out with the SANDER MD module of AMBER 6.0.

For analysis, energy data were saved every 10 time steps, solute coordinates every 0.5 ps and solvent coordinates every 2 ps. All results presented below refer to the 3.0 ns trajectories which exclude the first 100 ps required for temperature adjustment and equilibration (an equilibrated state with respect to the total potential energy in the system was reached by all three simulations within approximately 100 ps). Analyses were carried out primarily with programs of the AMBER 7.0 release (Case et al. 2002), while VMD (Humphrey et al. 1996) and PYMOL (DeLano 2002) were used for various visualization purposes.

4.1.3 Results and Discussion

Comparative binding-site analysis of aldose reductase crystal structures. Although it is already known that ligand complexation can lead to significant conformational changes in the binding site of aldose reductase (Urzhumtsev, Tete-Favier et al. 1997), the crystal structures available to date do not yet appear to represent all conformations that might potentially be adopted upon ligand binding, considering that structure determination of complexes with new inhibitors can still result in surprising binding modes. In part, this applies also to the complex with IDD594: as the following comparison with publicly available crystal structures will show, none of the other structures is fully compatible with the binding mode observed for the IDD594 ligand.

As mentioned in Materials and Methods, 12 aldose reductase structures are available for comparison. Superimposing their binding sites with the IDD594 complex using RELIBASE+ leads to C^α-rmsd values of 0.6 to 0.7 Å (Table 1) (for details about superposition and rmsd calculation in RELIBASE+ cf. (Hendlich, Bergner et al. 2003)). However, despite this good overall fit of the binding regions, the ligand (IDD594) would clash with each of the superimposed binding sites (a clash being a distance shorter than the sum of the van der Waals radii of the corresponding atoms). As shown in column 8 of Table 1, with exception of the zenarestat-bound structure (1iei) at least 8 clashes are observed in all cases. Most frequently these overlaps or short contacts are observed with Leu 300, while the residues Trp20, His110, Trp111, Thr113, and Phe122 are involved to a minor extent. In case of 1iei, only a few short contacts arise with Trp111 and Phe122, and none with Leu300. With respect to the IDD594 binding mode, this structure would, therefore, be the most "compatible". Nevertheless, as discussed further below, a series of other structural differences is observed in the 1iei binding site compared to the IDD594 complex structure.

Table 1. Comparison of the binding sites of aldose reductase crystal structures with the IDD594 complex (the starting structure of the MD simulations) as reference. Measurements were carried out after least-squares superposition of the binding site residues onto the reference structure. The PDB code of the structure is given in column 1, mutations of binding-site residues are reported in column 2, the name of the bound ligand is shown in the third column. Column 4 reports the C^α-rmsd of the binding site residues. In column 5, the number of C^α-atoms moved by ≥ 0.9 Å with respect to the reference is given, whereas column 6 reports the number of side-chain centers shifted by ≥ 1.0 Å. Column 7 lists the number of side-chain torsions differing by at least 10°. The number of clashes of the reference ligand with the superimposed binding site is given in column 8. Finally, the last column shows the percentage of volume overlap of the reference ligand with the ligand of the superimposed complex.

PDB	mutations	ligand	rmsd [Å]	Δ C ^α	Δ side chain	Δ torsion	clashes	ligand overlap
(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)
1ads	-	-	0.7	3	4	9	9	n.a.
1ah0	1	sorbinil	0.7	2	4	14	12	63%
1ah3	1	tolrestat	0.7	7	7	16	11	65%
1ah4	1	-	0.6	2	4	16	10	n.a.
1az1	2	alrestatin	0.7	4	5	10	8	30%
1eko	1	IDD384	0.7	4	5	22	11	53%
1el3	-	IDD384	0.6	1	3	9	8	56%
1iei	-	zenarestat	0.7	1	4	30	3	100%
2acq	-	glucose-6-P	0.7	3	4	10	10	43%
2acr	-	cacodylate	0.7	3	4	8	9	14%
2acs	-	citrate	0.7	3	4	9	9	42%
2acu	1	citrate	0.7	3	4	13	10	41%

As displayed in Table 1, all structures show some backbone (C^α -atom) and side-chain movements with respect to the IDD594 complex structure, but the extent to which these differences occur varies. From one (1el3, 1iei) to seven (1ah3) residues have their C^α -atom displaced by at least 0.9 Å, and between three (1el3) and seven (1ah3) side-chain centers move by 1.0 Å or more. Differences in side-chain torsion angles of more than 10° are abundant as well (it has to be noted, that 10° is often the accuracy limit of protein crystal structure determinations); in some cases, though, the net effect of these differences on the orientation of the corresponding side chain is compensated by changes of opposite direction in immediately adjacent torsions.

Residues involved in these variations are noted in Table 2, Table 3, and Table 4. Backbone shifts are most commonly observed for Ala299 and Leu300, but also for Val130 (the latter is already quite distant from the immediate binding site, with all but one contacts to IDD594 being larger than 7 Å; in addition, the only variation of Val130 within the data set is observed in the IDD594 complex, where the backbone is shifted and the χ_1 -angle is changed by ~120° such that one methyl group points into a different direction; in the remainder, Val130 is thus not further discussed). The Phe122 and Trp219 C^α -positions are also subject to frequent variations, though generally in a distance range of only 0.5 to 0.8 Å. Occasional C^α -shifts are also observed for Phe121, Pro218, and Val297.

As far as the side chains are concerned (Table 3), the largest center-to-center distances with respect to the superimposed reference are shown by Leu300. Equally frequent, but smaller are the differences observed for Tyr309. Also Val297 and Cys303 are often shifted to other conformations, whereas differences of Phe115, Phe122, and Ala299 are less frequent. Center-to-center distances, however, are not sufficient to characterize conformational differences, and thus Table 4 shows the torsional variations occurring in four frequently varying side chains. Leu300, but also Cys298 exhibit an impressive variability in their side chain torsion angles. The torsions of Phe122 and Cys303, instead, seem essentially to be confined to 2 or 3 distinct states.

Table 2. Movements of C^α-atoms in the binding site of various aldose reductase crystal structures, measured with respect to the superimposed reference structure (IDD594 complex). Only values ≥ 0.9 Å are explicitly reported.

PDB	Phe121	Phe122	Val130	Pro218	Trp219	Val297	Ala299	Leu300
1ads			1.1				0.9	2.3
1ah0			1.0					1.9
1ah3	0.9	1.1	1.1	0.9	0.9		1.4	1.1
1ah4							0.9	1.8
1az1			1.2		1.9		1.1	2.1
1eko			1.1			1.0	1.0	1.7
1el3								2.1
1iei				1.2				
2acq			1.2				0.9	2.2
2acr			1.2				1.0	2.2
2acs			1.2				0.9	2.2
2acu			1.1				0.9	2.3

Table 3. Movements of side-chain centers in the binding site of various aldose reductase crystal structures, measured with respect to the superimposed reference structure (IDD594 complex). Only values ≥ 1.0 Å are explicitly reported.

PDB	Phe115	Phe122	Val130	Val297	Ala299	Leu300	Cys303	Tyr309
1ads			1.6			4.3	1.0	1.2
1ah0			1.8	1.2		3.8		1.1
1ah3		2.1	2.0	1.3	1.2	3.1	1.4	1.0
1ah4			1.7	1.0		3.7		1.2
1az1		1.2	1.5			4.1	1.2	1.4
1eko		1.0	1.9	1.7		3.4		1.3
1el3			1.1			4.0		1.2
1iei	2.3			1.6	1.2			1.6
2acq			1.7			4.2	1.0	1.3
2acr			1.6			4.3	1.1	1.2
2acs			1.6			4.3	1.1	1.2
2acu			1.7			4.4	1.0	1.3

Table 4. Side-chain torsion angles of Phe122, Cys298, Leu300, and Cys303 in different aldose reductase crystal structures. Only values differing by at least 10° from the reference (IDD594 complex, line 1) are given in the table. Differences of more than 20° are highlighted in bold.

PDB	Phe122 χ_1	Phe122 χ_2	Cys298 χ_1	Leu300 χ_1	Leu300 χ_2	Cys303 χ_1
IDD594	169.4	87.4	87.6	61.2	60.0	166.7
1ads			167.2	109.9	-135.8	
1ah0	179.4		-171.7	75.1	81.4	-174.8
1ah3	-175.6	-77.6	172.5	154.6	-30.8	73.3
1ah4			155.9	75.9	72.3	-174.6
1az1	129.3			107.5	-130.0	
1eko		-79.6	102.2	87.0	71.7	
1el3		-88.9	170.3	114.3	-133.5	-174.2
1iei			139.3	72.1	158.0	
2acq			169.6	106.1	-140.6	
2acr			177.6	108.2	-137.1	
2acs			142.5	106.9	-135.8	
2acu		77.1	178.0	82.0	76.9	

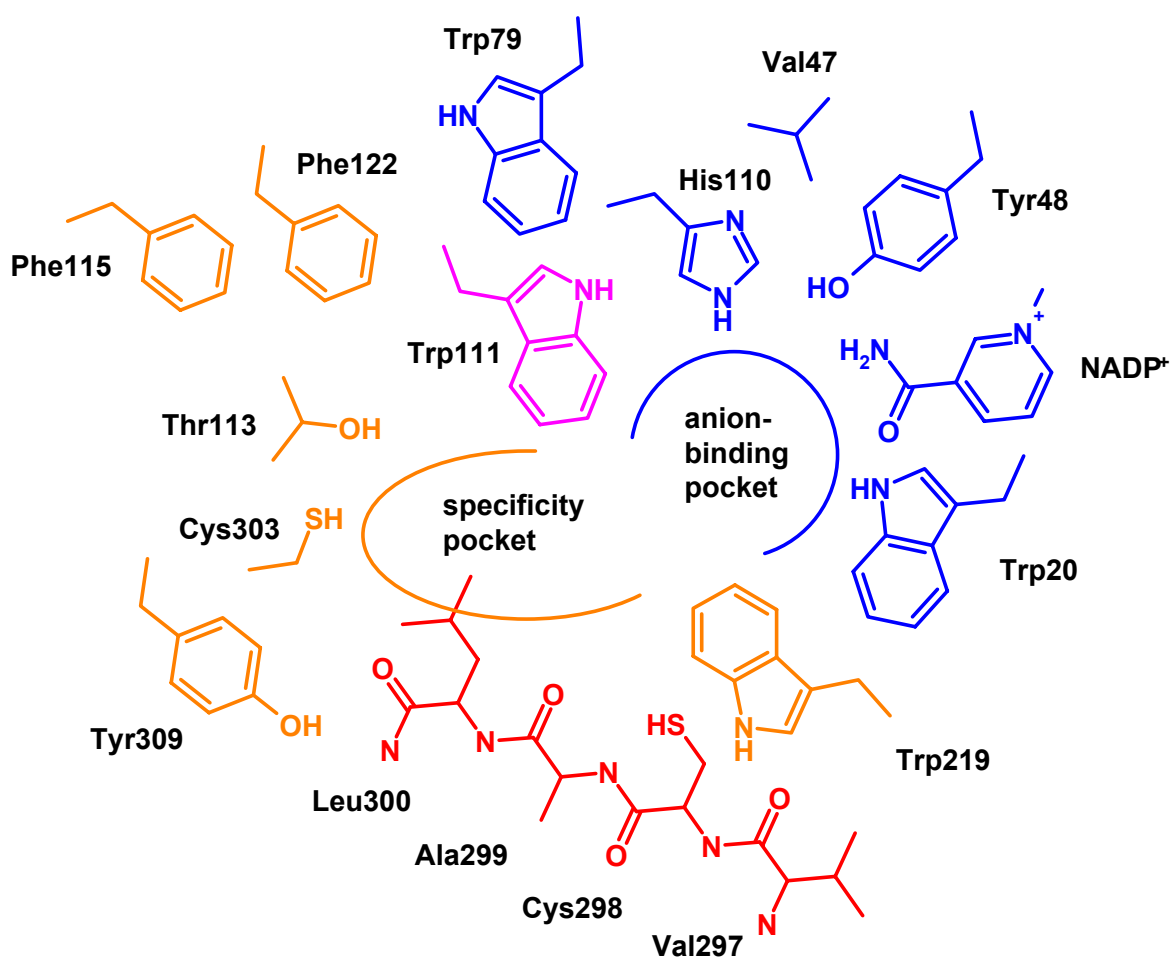


Figure 2. Schematic drawing of the aldose reductase binding pocket. The color-code refers to the degree of flexibility as derived from the MD simulations and the comparative X-ray structure analysis, with red for the most flexible regions and blue for the least mobile area.

Taken together, these comparisons provide a view of the binding site as composed half of an invariant part and half of a flexible part (Figure 2). The part which is superimposable very well for all structures and where differences are only rarely seen, is mainly formed by the pocket with the catalytic residues (anion-binding pocket) and its surrounding. This means that the arc going from Trp20 over Tyr48, Val47, and His110 to Trp79 is very well conserved; this includes also the entire cofactor (NADP⁺) which is almost perfectly superimposable in all cases. Also the adjacent Trp111, which forms an important π -stacking-border of the binding site, belongs still to the fairly invariant section, and minor shifts of this side chain are only observed in some of the crystal structures.

In contrast, in the other half of the binding site, frequent and recurring changes are found. Most affected is the segment from Val297 to Leu300 and the neighbouring regions occupied by Trp219 on the one hand and Cys303 and Tyr309 on the other. To a minor extent, significant variability is also shown by the area formed by Thr113, Phe121, and Phe122. By all

accounts, Leu300 is the most variable residue which essentially determines the appearance of the binding pocket and the accessible binding modes (cf. below). This is reflected also by the C^α-movements and the center-of-side-chain movements: for both parameters, the largest and most frequent differences are observed for Leu300 (cf. Table 2). It is, in fact, primarily the Leu300 neighborhood which mediates potential induced-fits, whereas the cofactor neighborhood with the catalytic residues provides a stable region for tight anchoring of essential functional groups.

Visual analysis of the superimposed binding sites reveals that the available crystal structures represent essentially four distinct binding site conformations (cf. Figure 3): besides the "IDD594"-conformation, this is the holo-conformation, the "tolrestat"-conformation, and the "zenarestat"-conformation. Most frequently is the holo-conformation as represented by the structure 1ads found in the set of analyzed crystal structures. A total of ten crystal structures can be assigned to this group (1ads, 1ah0, 1ah4, 1az1, 1eko, 1el3, 2acq, 2acr, 2acs, 2acu). Compared to the IDD594-conformation, this holo-conformation is characterized by an entirely different orientation of Leu300: the backbone is shifted by more than 2 Å towards the specificity pocket and the side chain is pointing into the pocket, towards Trp111. The backbone shift obviously also affects the immediately adjacent residues; this is of relevance primarily for Ala299, which delineates the binding pocket, whereas residue 301 (Leu in the human enzyme, but Met in porcine aldose reductase) is not really part of the binding site. The backbone is actually not only shifted, but also adopting a completely different conformation: compared to the IDD594 structure, both the Ala299 carbonyl and the Leu300 NH are pointing into opposite directions. Spatially neighboring residues are affected by these "changes": on the C-terminal side, Cys303 and especially Tyr309 are pushed away from the binding site (their position in the IDD594 structure would not be compatible with the holo-conformation of the Ala299 and Leu300 backbone); on the N-terminal side, the Cys298 side chain is pointing into another direction (χ_1 -difference of 80°), and Trp219 is slightly shifted in position.

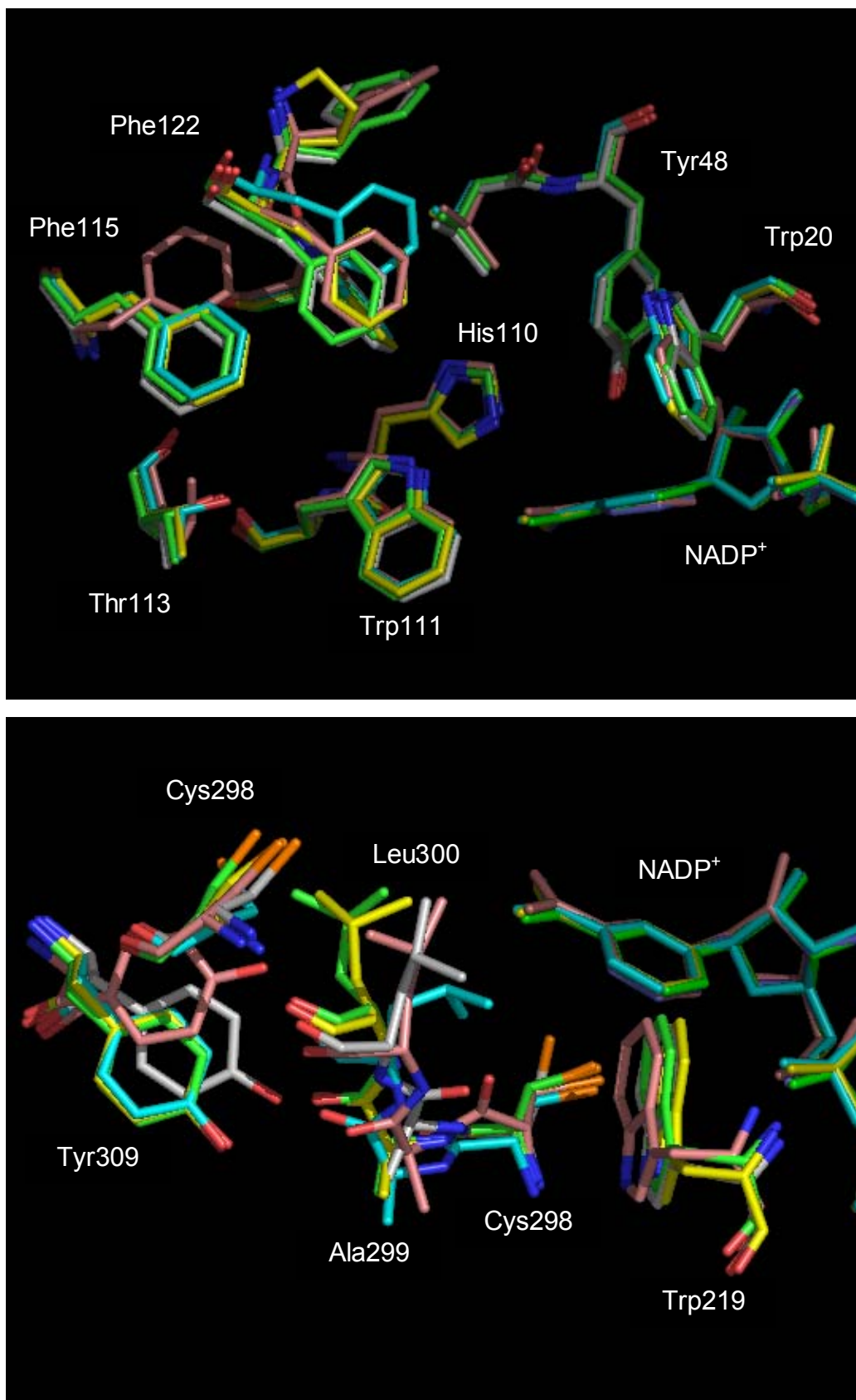


Figure 3. Comparison of five different binding site conformations from crystal structures. For clarity, the binding site representation is split into a top and a bottom part. The "IDD594"-conformation is shown in gray, the holo-conformation from 1ads in green, the holo-conformation from 1ah4 in yellow, the "tolrestat"-conformation (1ah3) in cyan, and the "zenarestat"-conformation (1iei) in pink.

A subgroup with minor differences to this standard holo-conformation is formed by 1ah0, 1ah4, and 1eko, which - in contrast to the other structures - are from porcine aldose reductase. Here, besides the differences mentioned above, a moderate shift of Phe122 is observed, which could be a consequence of the Phe121Pro mutation in the porcine protein. In addition, however, the Leu300 side chain adopts a different conformation, characterized by an almost 180°-flip of the χ_2 -angle. The *conformation* of the side chain is thus more similar to IDD594, but since the backbone differences still apply, the Leu300 side chain occupies the binding pocket also in the porcine structures, showing extensive volume overlap with the Leu300 orientation in the human holo-structures. Further differences in this subgroup with respect to the human holo-conformation are (very) small shifts of the Val297, Cys298, and Cys303 side chains.

The holo-conformation is also maintained in complexes with various ligands: sorbinil (1ah0), alrestatin (1az1), IDD384 (1eko, 1el3), as well as glucose-6-phosphate (2acq), cacodylate (2acr), and citrate (2acs) all bind to this conformation and do not induce significant alterations. Due to the position of Leu300, the specificity pocket between Leu300, Trp111, and Thr113 is not accessible, and all these ligands bind only in the "upper" part of the pocket which is closer to the catalytic site. Spatial overlap of the ligands with the IDD594 inhibitor is thus only observed with respect to its (5-fluoro-2-thiocarbamoyl-phenoxy)-acetic acid moiety. Given the smaller size of the pocket in this holo-conformation, larger ligands even have part of their structure rather exposed and not in tight contact with the protein; this is the case for IDD384 and alrestatin. In the crystal structure of the latter complex, two copies of the ligand are observed to bind, stacking onto each other and thus, apparently, compensating some of the lacking protein contacts.

A very different binding-site conformation is given by the tolrestat complex (1ah3). Here, the Leu300 side chain is also pointing into the pocket, but not so much towards Trp111, rather somewhat "lower", on top of the Ala299 backbone. This enables tolrestat to adopt a binding mode contacting Thr113, but with the aromatic ring plane situated above the Leu300 side chain (between Leu300 and Phe122) and perpendicular to the Trp111 plane, not parallel as in the IDD594 or the zenarestat complex! If superimposed onto the IDD594 complex structure, the carboxylate side chains of both ligands in the anion-binding pocket overlap very well; besides that, however, tolrestat would clash with Leu300, but also with Phe122 and Cys303. Accordingly, also the side chains of Phe122, Cys303, and Tyr309 are all shifted to open up a wider space. The backbone conformation of Ala299 and Leu300 is similar to the one observed in the holo-structures (e.g., 1ah4), but shifted a bit outwards from the pocket, such that the volume overlap with the IDD594 complex structure is somewhat increased.

A further distinct variant of binding-site conformations is given by the zenarestat complex 1iei (since this structure has been solved at the comparatively low resolution of 2.5 Å, it can not be excluded that some of the differences might also be attributed to the limited accuracy of this structure determination). Although the binding modes of zenarestat and IDD594 are fairly similar (a short contact of zenarestat with the superimposed IDD594 protein structure would arise only with the Cys298 side chain; for short contacts of IDD594 with the 1iei structure cf. above), there are many differences in the binding-site conformations of these two complexes. Four side chains centers (Phe115, Val 297, Ala 299, and Tyr 309) are moved by more than 1 Å and 30 side-chain torsion angles differ by more than 10°. The Cys298 side chain is in the same conformation as in the holo-structures, but the backbone carbonyl is pointing upwards instead of down towards the protein interior (the only example where this backbone conformation is observed). Consequently, also the following polar backbone groups are "switched" in their orientation, and the backbone as a whole is somewhat shifted. The Leu300 carbonyl is then again oriented the same way as in the IDD594 structure, though a shift is still present. The Leu300 side chain adopts a different χ_2 -conformation, such that only one methyl group (the one directed towards the binding pocket) overlaps in the two structures, whereas the others point in opposite directions. Around Thr113, the following differences are observed: despite a very similar ligand moiety binding here (Br-substituted aromatic ring), Thr113 itself is shifted and the side chain is in a different conformation, such that the oxygen is pointing "downwards" and adopting the position where the methyl group resides in the IDD594 structure. The Phe115 phenyl ring is shifted upwards, but kept in the same plane. Finally, also the side chains of the two other phenylalanines, Phe121 and Phe122, are found in slightly different positions.

Taken together, the available crystal structures suggest that induced-fit phenomena in aldose reductase are mainly mediated by Leu300, the side chain of which is responsible for opening or closing hydrophobic subpockets in the binding site. In addition, the Cys298-Leu300 backbone plays an important role by alternatively exposing hydrogen bond donor or acceptor functionalities towards the binding site. Additional adaptations are mediated by Cys303, Tyr309, Thr113, as well as by the aromatic rings of Phe115 and Phe122.

Molecular dynamics simulations. What do MD simulations reveal about dynamics and conformational flexibility of the aldose reductase structure in general and its binding site in particular? To probe binding site flexibility in a more comprehensive way, three different simulations were setup based on the IDD594 complex structure: the aldose reductase structure with ligand at standard temperature (simulation "*lig_300K*"), without ligand at

standard temperature (simulation "*no_lig_300K*"), and without ligand at elevated temperature (simulation "*no_lig_350K*"), as described in more detail in the Methods section. The cofactor was included in all three cases.

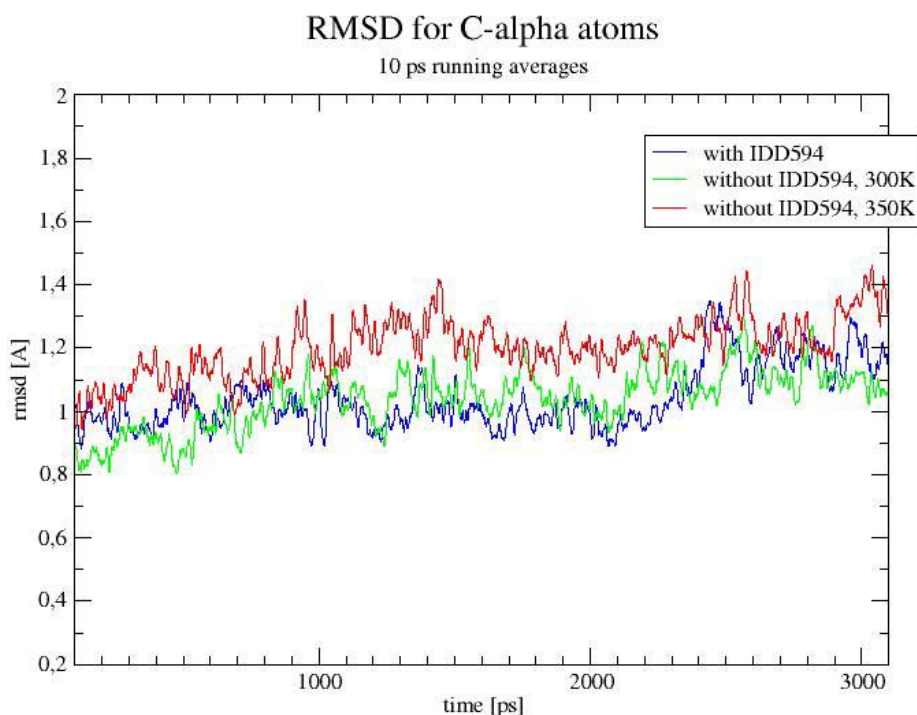


Figure 4. Comparison of the C $^{\alpha}$ -rms deviations for all three trajectories.

Generally speaking, all three simulations show a comparatively high stability of the overall fold. The trajectory average of the C $^{\alpha}$ -atom rms deviation from the X-ray structure used as starting point is only 1.04 ± 0.11 Å for simulation *lig_300K*, of equal size (1.04 ± 0.10 Å) for the uncomplexed simulation at standard temperature, and somewhat higher - but still at a surprisingly low level - for the high-temperature simulation (1.20 ± 0.10 Å) (cf. Figure 4). This is a clear reflection of the fact that aldose reductase is an enzyme with a compact globular fold. Remarkably, this stability is not only observed in the reference simulation, but also in the other two simulations - perturbed by removing the ligand from the binding site - which already indicates that structural changes upon ligand binding should rather be of local nature and not lead to large-scale shifts affecting the entire fold. If measured over all atoms instead of only the C $^{\alpha}$ -trace, the trajectory-averaged rmsd values are 1.47 ± 0.10 Å for *lig_300K*, 1.54 ± 0.11 Å for *no_lig_300K*, and 1.71 ± 0.12 Å for *no_lig_350K*, reflecting the obviously more pronounced adaptations when side chains are being considered as well. Still, the absolute

values remain moderate, as do the standard deviations of the averages, indicating rather attenuated overall fluctuations. The relative magnitudes of the rmsd values are in agreement with the expected larger deviations for the uncomplexed simulations, especially when conducted at higher temperature.

These differences become even more pronounced when the rmsd analysis is restricted to the binding site residues (as defined in the Methods section). In the simulation with the ligand, the all-atom rmsd for the binding site is $1.11 \pm 0.20 \text{ \AA}$ (C^α -rmsd $0.90 \pm 0.15 \text{ \AA}$), whereas values of $1.58 \pm 0.25 \text{ \AA}$ (C^α : $1.12 \pm 0.19 \text{ \AA}$) and $1.85 \pm 0.20 \text{ \AA}$ (C^α : $1.41 \pm 0.18 \text{ \AA}$) are measured for simulation *no_lig_300K* and *no_lig_350K*, respectively. Clearly, some structural changes must have occurred in the binding site upon ligand removal which do not occur when the ligand is present. Furthermore, as indicated by the larger standard deviations, the fluctuations and thus the degree of mobility of the binding site residues seem to be significantly higher than for the overall structure.

Being the area of highest interest in the context of structure-based drug design and with respect to issues of flexibility, in the remainder the focus will be exclusively on the binding-site region. As a reference for the following discussions, the simulation with the ligand (*lig_300K*) will be analyzed in detail first.

MD simulations of the complexed state. In the complex, the ligand is tightly bound within the deep pocket and is well kept in its position during the simulation as indicated by a rmsd of $1.15 \pm 0.28 \text{ \AA}$ measured for the ligand atoms based on the binding-site all-atom fit mentioned above. Nevertheless, it retains a considerable degree of residual mobility which is likely to indicate a favorable entropic contribution to the binding free energy. This mobility is most evident in the fluctuations of the p-bromo-o-fluorophenyl ring sandwiched between the Leu300 and Trp111 side chains, as well as in the torsional motions around the two ether bonds and the bond leading off the p-bromo-o-fluorophenyl ring. The other torsions of the ligand show smaller fluctuations. The interaction of the two carboxylate oxygens with the residues of the catalytic center Tyr48, His110, and Trp111 is extremely well conserved. The six average distances of the two oxygens to the donor hydrogens of these three residues show standard deviations of $0.12 - 0.24 \text{ \AA}$ and thus rather moderate fluctuations. Interestingly, four of the six distances are even shortened compared to the starting value, indicating a very favorable interaction motif. Conformationally the least fluctuating part is formed by the thioamide group and the immediately adjacent bonds. The standard deviations for these torsions are all below 13.5° . The thioamide itself retains its planarity, and the N-C.sp³ torsion shows an average in excellent agreement with the starting value (96.6° versus 102.1°), whereas

the torsion of the C.sp²-C.sp² single bond connecting the thioamide with the aromatic ring is shifted to a slightly higher value (i.e., -7.2° instead of -42.2°). This is probably related to the fact that the intramolecular hydrogen bond between the thioamide hydrogen and the ether oxygen is shortened in the early phase of the simulation (from 2.3 to 1.9 Å), but is then stably maintained along the entire trajectory (standard deviation < 0.1 Å). This intramolecular hydrogen bond has been attributed an important role for the high affinity of IDD594 and related ligands, as it preorganizes the free ligand in a conformation suitable for binding (Van Zandt, Sibley et al. 1999). The simulation underlines the importance of this internal interaction.

Despite the overall compactness of the fold and the presence of the ligand, significant conformational variations are observed in simulation *lig_300K* for parts of the binding site. Distance measurements across and along the binding site reveal that one half maintains a very stable conformation during the simulation, whereas residues of the other half are more flexible. The most stable part is formed by the residues Trp20, Tyr48, Trp79, His110, and Trp111, including also Thr113. As reflected by the values in Table 5, the mutual distances between these residues show very low fluctuations and averages which remain close to the starting values. Also NADP⁺, the cofactor, is part of this stable subpocket, called the anion-binding pocket, and shows only very restricted mobility throughout the simulation.

In contrast, much larger fluctuations are observed for the other half of the binding pocket, the specificity pocket, including especially Leu 300, Trp 219, and Phe122, but also Cys298 and Cys303, as listed in Table 5 and graphically displayed in Figure 5.

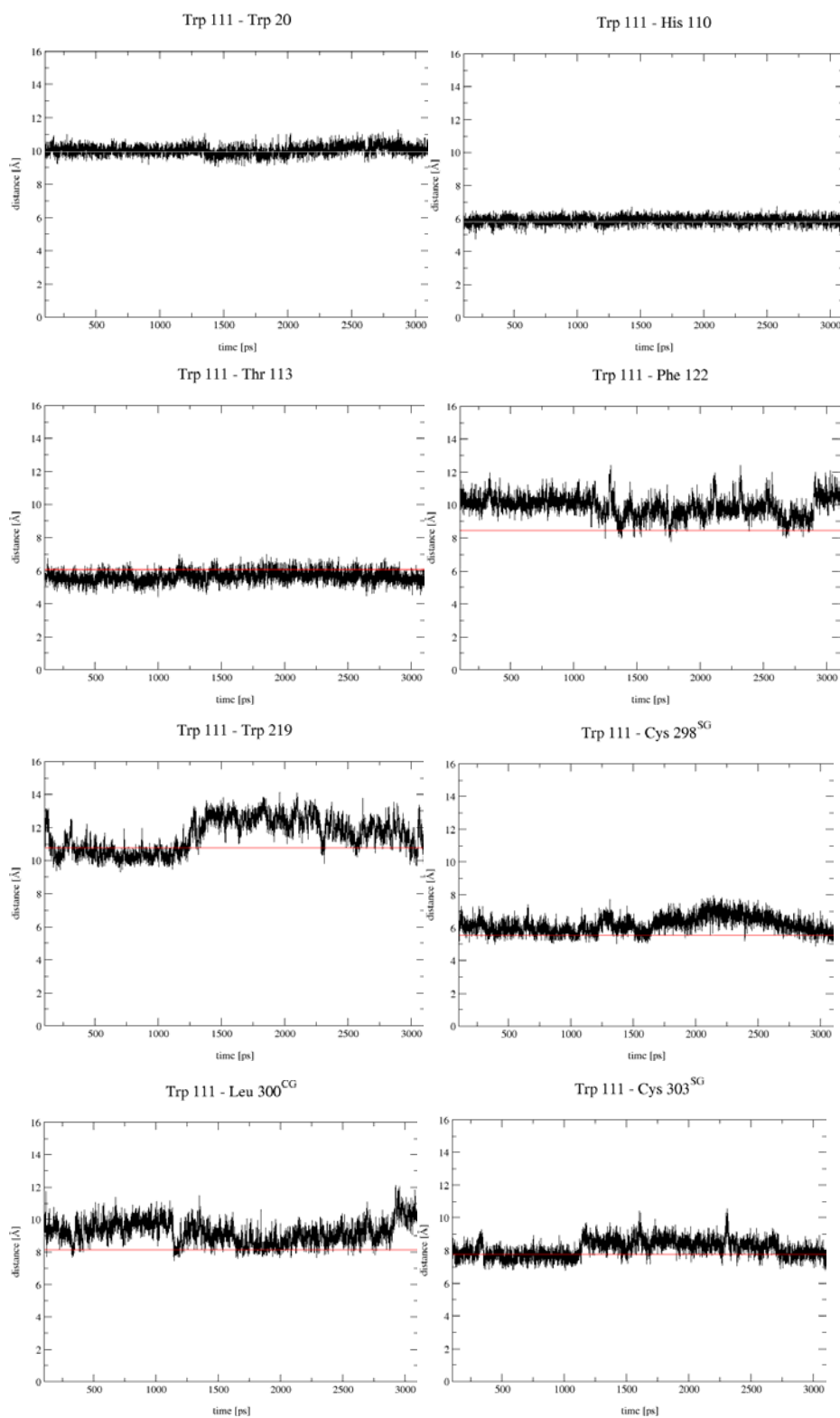


Figure 5. Characteristic binding-site distances measured to Trp111 in the simulation of the complex (*lig_300K*). Cf. Table 5 for further details.

The most flexible behavior is shown by Leu300. This is clearly reflected by the distance to Trp111 across the binding pocket (measured between atom CG of Leu300 and the geometric center of the Trp indole ring). Trp111 itself maintains its position very well. This distance to Leu300, however, oscillates between a minimum of 7.5 Å and a maximum of 12.1 Å. With an average of 9.2 ± 0.72 Å, the distance is widened by 1.1 Å compared to the starting value of 8.1 Å in the crystal structure. A histogram analysis shows, though, that in 7.3 % of the 6000 trajectory conformations this distance is 8.2 Å or less (≤ 8.6 Å in 20.6 %). Thus, the starting distance is still adopted quite frequently, but the high mobility of this residue allows a wide range of distances to be sampled, and if transitions occur they preferably lead to distances beyond 9 Å. The distances of Leu300 to its neighboring residues Trp219 and Cys303 show averages very close to the starting values, but very large fluctuations either (Trp219: 7.3 ± 1.3 Å, starting value 7.7 Å; Cys 303: 4.6 ± 0.7 Å, starting value 4.4 Å). The Trp219 distance fluctuations are especially high since Trp219 itself exhibits a high degree of flexibility, but its motion is not tightly coupled to Leu300. On the other hand, the Cys303 side chain shows occasional transition into an alternative conformation (with χ_1 changing from $\sim 180^\circ$ to $60-80^\circ$), leading to a correspondingly higher distance for the period during which this conformation is maintained (~ 500 ps). Conversely, the distance to the conformationally fairly well conserved Thr113 is lowered when the Cys303 side chain adopts this conformation. Yet the trajectory average of the χ_1 -torsion is in perfect agreement with the starting value in the crystal structure ($167.1^\circ \pm 26.7^\circ$ versus 166.7°). The situation is somewhat different with respect to the other cysteine in the binding site, Cys298. Here, during equilibration a transition occurs from the starting value of 87.6° towards values around 170° (trajectory average of $170.5^\circ \pm 11.1^\circ$). Interestingly, a conformational disorder over two states was crystallographically observed for this residue. An interesting behavior is also observed for the side chain of Phe122. While the χ_2 -torsion remains at the starting value throughout the simulation, two different conformations are adopted by the χ_1 -torsion (cf. Figure 6): $\sim 75^\circ$ on the one hand and $\sim 170^\circ$ on the other, the latter being reminiscent of the 169.4° starting value. The two conformations are populated in a ratio of roughly 40:60.

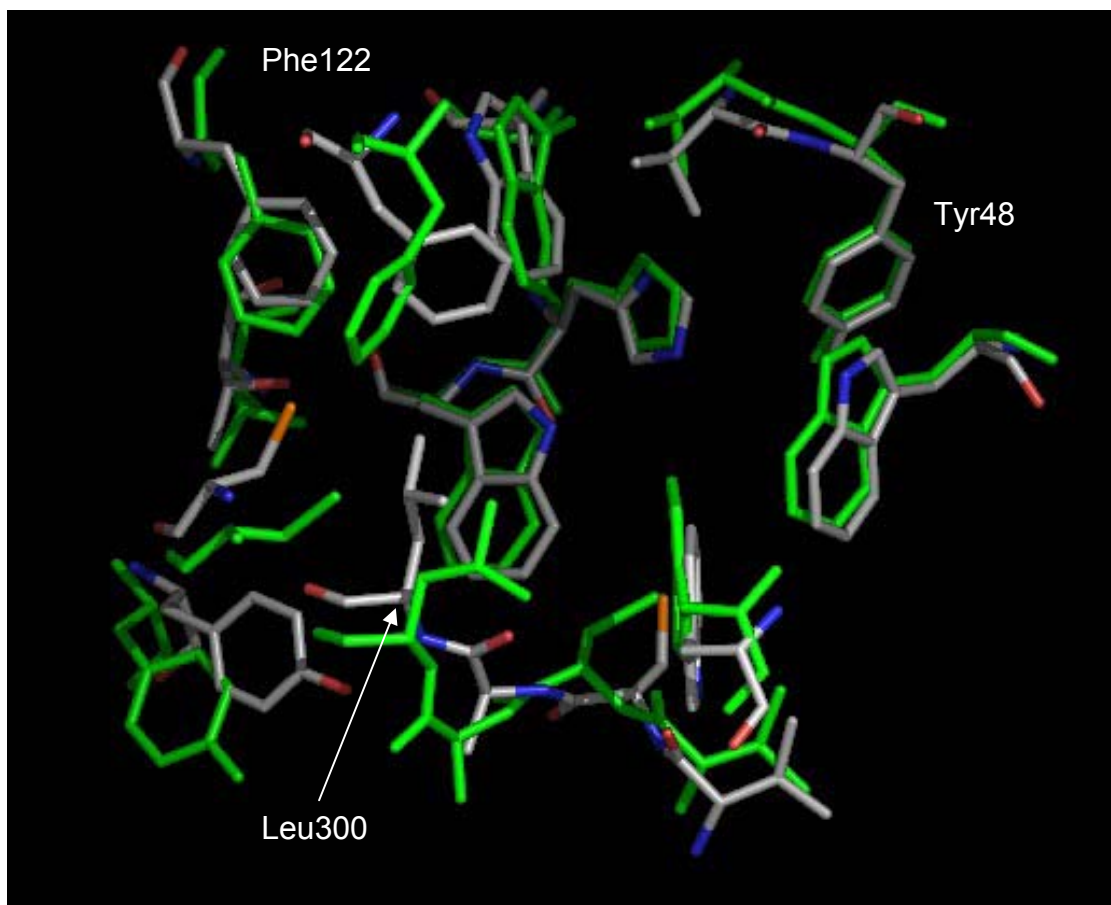


Figure 6. Trajectory snapshot of simulation *lig_300K* (green) compared to the crystal structure. The snapshot shows the alternative binding site conformation C1 sampled by the trajectory besides the main crystallographically observed conformation (cf. the 2D-rmsd and cluster analysis reported in the text). The main differences are in the Leu300 region, including Ala299 and Cys298 on the right, and Cys298 and Tyr309 on the left, as well as in the Phe122 conformation. The anion-binding pocket surrounding Tyr48, instead, shows no variation. For reasons of clarity, the ligand has been omitted from the representation.

Table 5. Binding site distances, measured in the three simulations and compared with starting values of the crystal structure. All values are given in Å. For His, Phe, Trp, and Tyr residues the geometric center of the corresponding ring system was used in the distance measurements, unless otherwise noted; for NADP⁺, the nicotinamide ring was used for the same purpose. In all other cases, the atom to which the distance was measured is explicitly given. The lines of the two table sections are sorted by residue number.

	<i>start</i>	<i>lig_300K</i>	<i>no_lig_300K</i>	<i>no_lig_350K</i>
<i>binding site area of low flexibility</i>				
Trp20 - NADP ⁺	5.69	6.02±0.31	5.91±0.56	5.58±0.51
Trp20 - Trp79	10.98	10.19±0.40	10.25±0.45	10.43±0.57
Trp20 - His110	8.79	8.68±0.25	8.32±0.53	8.06±0.48
Trp20 - Trp111	9.96	10.04±0.30	10.49±0.71	10.32±0.68
Tyr48 ^{OH} - His110 ^{NE2}	3.72	3.95±0.24	4.21±0.36	4.43±0.52
His110 - Trp111	5.81	5.89±0.24	6.23±0.45	6.23±0.57
Trp111 - Thr113 ^{OG1}	6.05	5.63±0.36	5.28±0.42	5.17±0.49
<i>binding site area of high flexibility</i>				
Trp20 - Trp219	7.16	7.19±0.48	7.18±0.83	10.75±1.22
Trp79 - Phe122	5.47	6.28±1.07	6.13±0.96	6.33±0.96
Trp111 - Phe122	8.45	9.91±0.64	9.41±0.68	9.81±0.82
Trp111 - Trp219	10.78	11.52±1.03	12.96±0.88	14.88±0.88
Trp111 - Cys298 ^{SG}	5.53	6.19±0.52	8.19±1.34	8.03±1.33
Trp111 - Leu300 ^{CG}	8.15	9.24±0.72	5.01±0.53	4.89±0.59
Trp111 - Cys303 ^{SG}	7.77	8.13±0.55	7.56±0.63	7.52±1.09
Thr113 ^{OG1} - Cys303 ^{SG}	5.70	6.18±0.63	4.95±0.86	4.98±0.93
Phe115 - Ala299 ^{CA}	12.19	12.46±0.57	12.38±0.47	12.36±0.57
Trp219 - Leu300 ^{CG}	7.76	7.27±1.35	11.33±1.37	12.96±1.04
Leu300 ^{CG} - Cys303 ^{SG}	4.37	4.56±0.67	4.24±0.51	4.84±0.76

Mobility in this area is not restricted to the side chain level, but includes sections of the backbone as well. In fact, Leu300 is part of a highly mobile backbone stretch in the binding pocket, leading from Val297 to Leu300. Especially ψ^{Ala299} and ϕ^{Leu300} show large fluctuations and oscillate between two states ("state 1" and "state 2") that differ by about $100 - 120^\circ$ (Ala299: ψ_1 $30 - 40^\circ$, ψ_2 $150 - 160^\circ$; Leu300: ϕ_1 $-50 - -70^\circ$, ϕ_2 $-150 - -160^\circ$). The oscillations of these torsions are such that they compensate each other with respect to the conformational net effect on the preceding and subsequent backbone section. Obviously, however, the orientation of the Ala299 carbonyl and the Leu300 amide changes depending on the adopted torsions: while state 2 largely corresponds to the conformation observed in the crystal structure, state 1 represents an alternative conformation where the Ala299 carbonyl is pointing away from the binding site while the Leu300 amide is oriented towards the binding pocket (cf. Figure 6). Generally, the backbone mobility is also of interest in the context of the high variability observed for the Leu300 side chain and its key role in binding site adaptations. Since Leu300 is the largest side chain of this backbone section and is furthermore exposed towards the binding pocket, the effect of backbone mobility on the binding-site shape is enhanced by this residue.

Taken together, the simulation of the complexed state (*lig_300K*) provides a view of the binding site as being composed half of a rigid section and half of a flexible part. The rigid section is formed by the anion-binding pocket and its surroundings, whereas flexibility is mediated by a mobile backbone stretch (Val297-Leu300), with the Leu300 side chain as main "amplifier" and neighboring side chains as "modulators". Two major distinct states of the binding site can be discerned in the trajectory: one which bears high resemblance to the crystallographically observed conformation and a second which is characterized by an "out-swing" of the Leu300 side chain, a χ_1 -flip of Phe122 and a shift of the Cys303 and Tyr309 side chains, in the majority of the cases combined with torsion state 1 of the Ala299 - Leu300 backbone, as described above (cf. Figure 6).

More quantitatively, this observation is confirmed by a mutual comparison of the trajectory snapshots of the binding site in terms of 2D-rmsd plots and hierarchical cluster analysis. 150 snapshots were used for this purpose, taken at regular intervals of 20 ps over the entire 3 ns trajectory (a comparative analysis using 600 snapshots with 5 ps intervals did not reveal further insights and was computationally less feasible). It is immediately apparent from Figure 7 that two main conformational families or substates can be distinguished and that transitions occur between them. The one observed first in the sampled trajectory will be called "conformation 1" or C1 (lower left part of the plot in Figure 7), while the other will be called "conformation 2" or C2. Essentially, C2 corresponds to the conformation observed in the crystal structure

used as starting point, while C1 is characterized by a jointly adopted alternative conformation of the most flexible residues, as mentioned in the preceeding paragraph and shown in Figure 6. C2 is the more populated state ($\sim 60\%$), while C1 is observed less frequently ($\sim 40\%$). Interestingly, after the initial 100 ps of thermalization and equilibration, the sampling phase of the simulation starts with C1, which means that during the equilibration phase a transition must have occurred. A clear-cut second transition is observed after 1130 ps, apparent as a sharp borderline between light and dark squares in the lower left third of the plot. In this transition area, the rmsd jumps from ~ 0.7 Å (conformations of the same family) to up to 1.7 Å (conformations of different families). The conformational family C2 is then maintained for about 1800 ps, before a new transition to C1 occurs. Light-gray crosspeaks indicate that it is indeed a C1-like state which is being revisited in the last 200 ps.

A perfectly complementary picture emerges from hierarchical cluster analysis (HCA) based on the mutual rms deviations of the same 150 binding site conformations. As can be seen in Figure 8, the 150 snapshots clearly separate into two main clusters (level 1), populated at a ratio of 40:60 and corresponding to C1 and C2, respectively. C2 further separates into three subclusters (level 2), whereas C1 is composed of two subclusters. In the latter case, the larger subcluster is mainly composed of snapshots from the first-1-ns block of C1, but also a few snapshots from the last-200-ps block; the smaller subcluster, instead, shows a higher proportion of frames from the last-200-ps block.

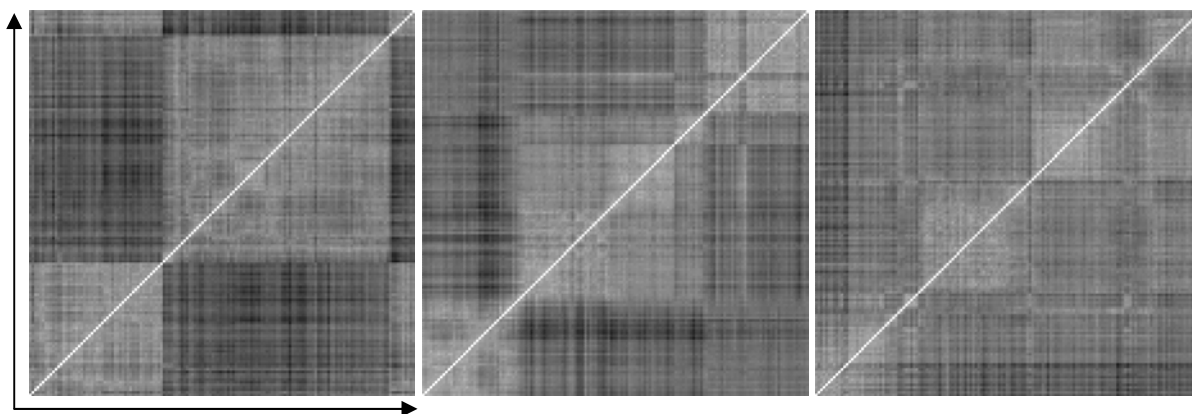


Figure 7. 2D-rmsd plots, based on a superposition of all binding site atoms using snapshots taken every 20 ps (a total of 150 conformations). Left: simulation *lig_300K*; middle: simulation *no_lig_300K*; right: simulation *no_lig_350K*. In each diagram, the 150 consecutive snapshots are plotted from left to right and from bottom to top. Each square in the plot holds the mutual rmsd between the two snapshots, which is represented with a relative gray-scale code: white corresponds to 0 Å rmsd, black to the maximum rmsd observed within the given plot. The maximum deviations are 2.03 Å for *lig_300K* (left), 2.49 Å for *no_lig_300K* (middle), and 2.81 Å for *no_lig_350K* (right).

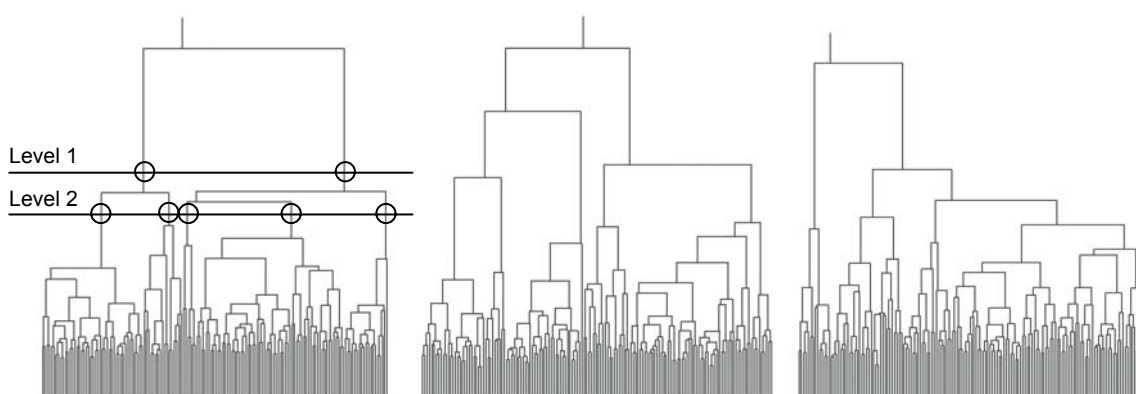


Figure 8. Hierarchical cluster analysis based on the mutual rms deviations of the same 150 binding site conformations as in Figure 7. Left: simulation *lig_300K*; middle: simulation *no_lig_300K*; right: simulation *no_lig_350K*.

MD simulations of the uncomplexed state. Without the IDD594 ligand in the binding pocket, a significantly different result is obtained when subjecting the aldose reductase structure to MD simulations. Already at the standard temperature of 300 K, a more diverse set of binding-site conformations is sampled. This is immediately evident from the 2D-rmsd plot and the “Hierarchical Cluster Analysis” (HCA) diagram for simulation *no_lig_300K*, both prepared identically as for simulation *lig_300K* above (cf. Figure 7 and Figure 8). Depending on where the threshold is set, four to five major conformational clusters can be discerned. The maximum deviation among any of the 11175 snapshot pairs is 2.49 Å (2.03 Å in case of simulation *lig_300K*). At elevated temperature (350 K) the sampled conformations are of even higher diversity. For simulation *no_lig_350K* the maximum deviation among the snapshots is 2.81 Å and about six main clusters are revealed by the 2D-rmsd and HCA graphs. Frequent transitions between these conformational states occur during the simulation, indicative of the high thermal energy available to the system.

An instructive composite picture and a comparative overview of the conformational space sampled in all three simulations together (i.e., *lig_300K*, *no_lig_300K*, and *no_lig_350K*) is obtained by generating a 2D-rmsd and HCA diagram for the combined $3 \times 150 = 450$ snapshots, as shown in Figure 9. The maximum deviation observed for any of these 101025 pairs is 3.37 Å. The 2D-rmsd plot provides clear evidence for the fact that the simulation of the complex (*lig_300K*) has a fairly distinct character compared to the uncomplexed simulations. On the one hand, less conformational states are visited during the simulation (only two, essentially; cf. the bottom left part of the plot). On the other hand, these conformations clearly differ from those sampled by the uncomplexed simulations (cf. the dark areas in the bottom third or left third of the plot). This applies especially to the less populated of these two states (C1), which, as shown above, is the one less similar to the IDD594 crystal structure. The more populated, "crystallographic" state C2, instead, bears a slightly better resemblance to some of the uncomplexed conformations, primarily those from the early stages of simulation *no_lig_300K*.

Based on the composite HCA diagram, it appears most reasonable to distinguish 8-10 major clusters. For the following discussion, the threshold is set at a level of 9 clusters (cf. Figure 9 and Table 6). Cluster 1 and 2 consist entirely of *lig_300K* conformations and essentially correspond to C1 and C2, respectively, as described above. Some conformations of simulation *lig_300K*, however, do also occur in cluster 3 (C3) in which the majority of the conformations comes from simulation *no_lig_300K*. This is reasonable, since in the first third of the uncomplexed simulation at standard temperature binding-site conformations more similar to

the crystallographic state are still observed, as mentioned above. Significant differences between C2 and C3 are mostly confined to shifts in Leu300, Trp219, and Phe122.

Table 6. Cluster composition based on the hierarchical cluster analysis comprising all three simulations (450 snapshots) as shown in Figure 9.

Cluster	number of members	from simulation
1	53	<i>lig_300K</i>
2	79	<i>lig_300K</i>
3	18	<i>lig_300K</i>
	23	<i>no_lig_300K</i>
4	66	<i>no_lig_300K</i>
	4	<i>no_lig_350K</i>
5	49	<i>no_lig_300K</i>
	2	<i>no_lig_350K</i>
6	12	<i>no_lig_300K</i>
	14	<i>no_lig_350K</i>
7	12	<i>no_lig_350K</i>
8	83	<i>no_lig_350K</i>
9	35	<i>no_lig_350K</i>

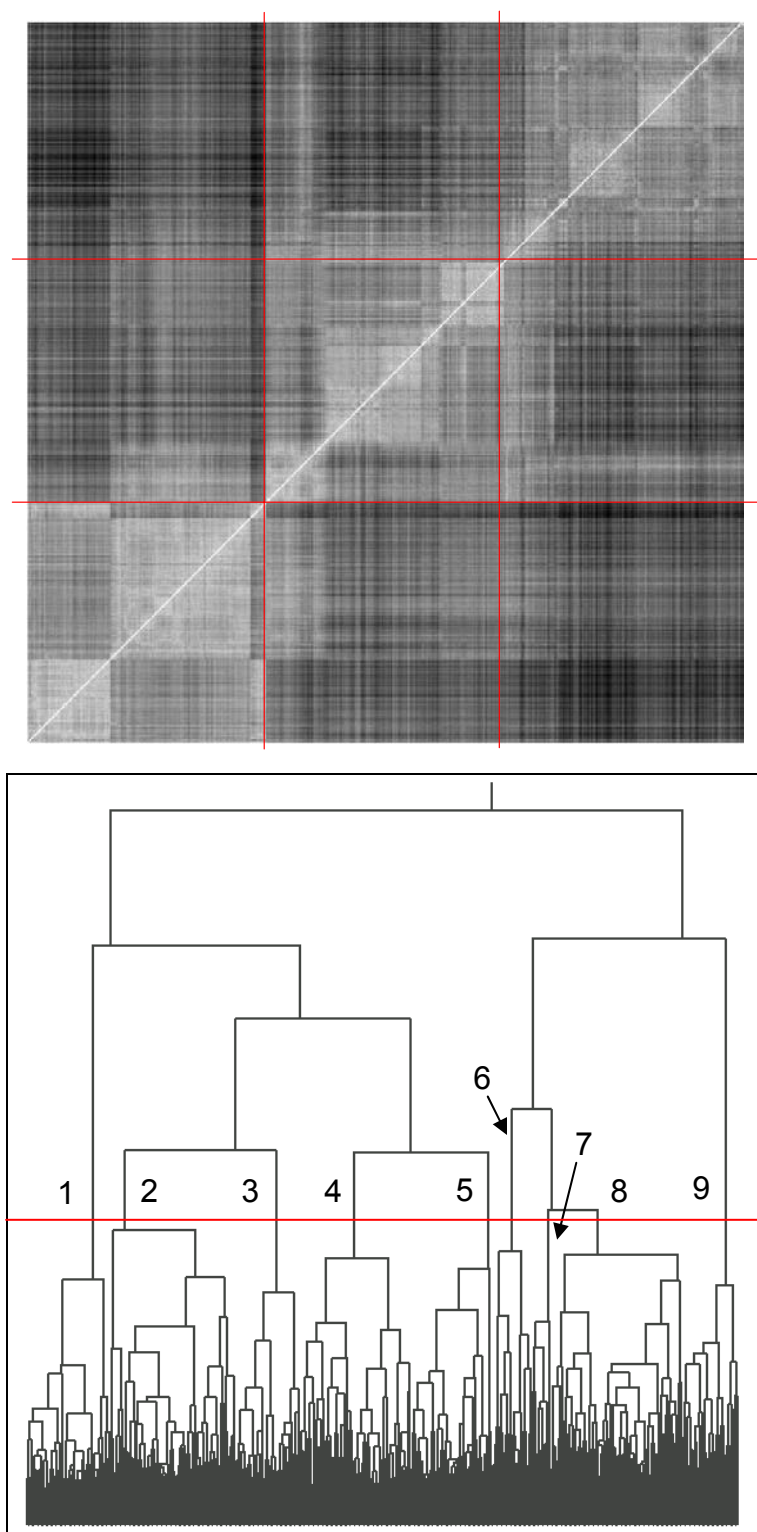


Figure 9. Combined 2D-rmsd plot (top) and hierarchical cluster analysis (bottom) for all three simulations, using the same conformations as in Figures 7 and 8. This results in 450 different conformations in the analysis. In the 2D-rmsd plot, the order of the conformations from left to right and bottom to top is as follows: first the *lig_300K* conformations, then the *no_lig_300K* conformations, and finally the *no_lig_350K* conformations. The maximum rmsd between any of these conformations is 3.37 Å. The red line in the cluster diagram corresponds to the threshold set for the discussion of the major conformational families (cf. Table 6).

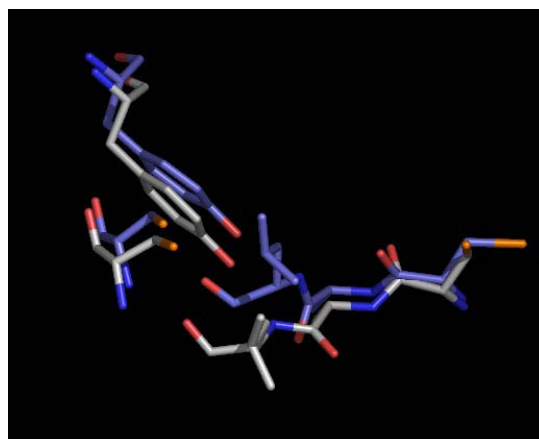
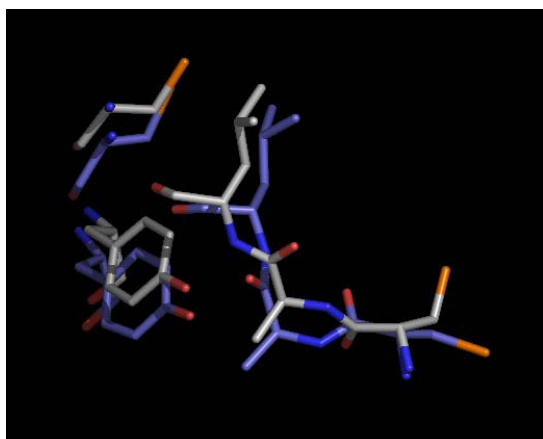
The remaining six clusters are exclusively formed by conformations of the uncomplexed simulations (cf. Table 6): two are dominated by *no_lig_300K* conformations, one consists of an almost equal number of conformations from both simulations, and the remaining three are formed by *no_lig_350K* conformations only. This distribution and composition of clusters is again a reflection of the fact that conformational sampling is significantly more diverse in case of the uncomplexed simulations and - not unexpectedly - further increases at higher temperature.

A comparison of members from each cluster provides insight into the conformational states sampled during the simulations. Most important is the fact that in the uncomplexed simulations, Leu300 generally adopts a position much closer to Trp111 than in the IDD594 complex structure and thus closes the specificity pocket. This is also apparent from the distance measurements reported in Table 5. Again, since Trp111 itself shows only minor swings of its aromatic side chain, most of the differences observed in the distances in comparison to the complexed state can be attributed to the other residue to which the measurement refers to. The most drastic changes are observed with respect to Leu300, Cys298, and Trp219, indicating that Leu300 moves into the binding pocket, whereas Trp219 shifts further out and Cys298 preferably adopts a conformation where the side chain points away from Trp111.

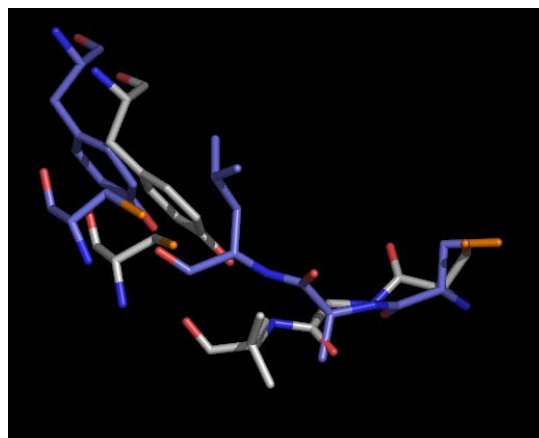
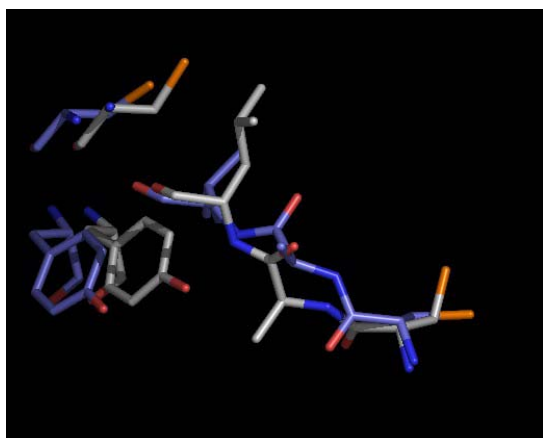
The closing of the specificity pocket by Leu300 is most persistently observed in the *no_lig_300K* simulation, while at higher temperature (*no_lig_350K*) conformations also occur in which the Leu300 side chain is found again in a bound-state-like orientation, with the specificity pocket partially opened (this applies to subclusters of cluster 8). It is remarkable that this open conformation is revisited at intermediate stages of the high-temperature simulation although closed conformations appear clearly preferred when no ligand is present. This has important implications, as further discussed below.

The "closed state" of Leu300 seems not so much determined by the side chain torsions of this residue, but rather by its backbone orientation. The effect of altered backbone conformations on the binding pocket, however, is largely amplified by the Leu side chain. The Leu300 backbone orientation, in turn, depends to a good extent on the Ala299 and Cys298 backbone conformation. Considerable flexibility is actually mediated by this backbone segment. In cluster 5, for example, conformations are even observed in which the hydrogen bonding pattern exposed to the binding site is switched, such that the Ala299 carbonyl and the Ala299 amide are addressable by hydrogen bonding partners of a ligand whereas the Cys298 carbonyl is not (cf. Figure 10).

Cluster 3



Cluster 5



Cluster 9

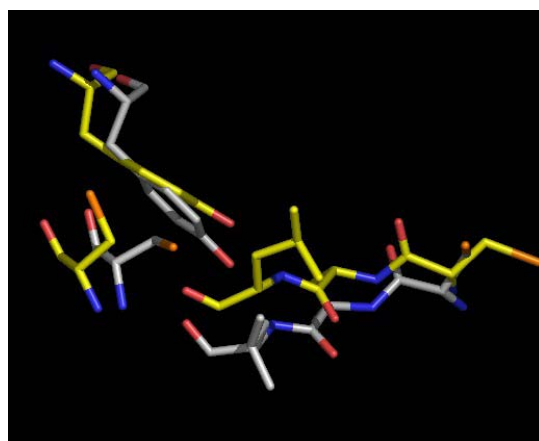
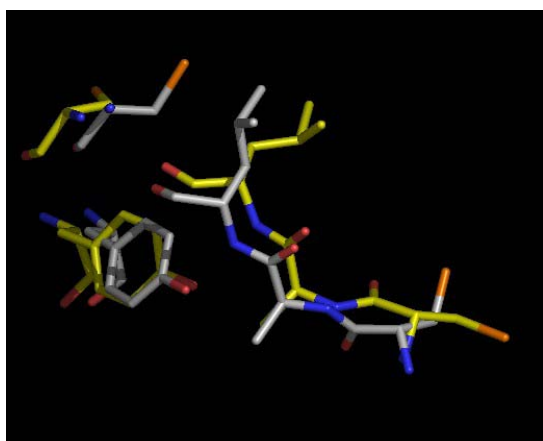


Figure 10. Comparison of MD-generated conformations from three different clusters with the IDD594 crystal structure, showing the residues Leu300, Ala299, Cys298, as well as Tyr309 and Cys303. The X-ray structure is shown in grey, conformations obtained from *no_lig_300K* in blue (cluster 3 and 5) and the conformation obtained from *no_lig_350K* in yellow. Figures on the left and on the right show the identical conformation from two different views.

The comparative analysis of the different clusters also clearly reveals that the Cys303 and Tyr309 position is tightly coupled with the Leu300 orientation. Whenever the Leu300 side chain adopts a position pointing into the specificity pocket, both Tyr309 and Cys303 are slightly pushed outwards since their position in the IDD594-complexed state would not be compatible with the new Leu300 orientation (cf. Figure 10).

Considerable variability is furthermore observed for Trp219. This, however, is not caused by this residue's side chain torsions, but rather by the dramatic backbone mobility of the loop segment between Pro215 and Pro225. Despite the high conformational flexibility of the segment, the effect on the binding site geometry is moderate because only the Trp219 side chain is exposed towards the pocket. In addition, the relative movement of Trp219 does not appear to be correlated with other changes in the binding site.

A further potentially important motion for the shape of the binding site are the oscillations of the Phe122 side chain governed by the χ_1 angle, onto which occasional minor shifts originating at the backbone are superimposed. The two states of χ_1 are distributed around 80-90° on the one hand and 170-180° on the other. This oscillation, however, has also been observed in the complex simulation. In contrast, 180°-flips of the χ_2 angle (viz., phenyl ring plane) are observed only in the uncomplexed simulations, but not for the complex.

Despite of all these variations, the anion-binding pocket with its surroundings (i.e., NADP⁺, Trp20, Val47, Tyr48, Trp79, His110) keeps its position very well and shows an essentially identical conformation in all the clusters. This is remarkable since in the uncomplexed state a stabilizing ligand group (carboxylate) bridging Tyr48 and His110 via hydrogen bonds is absent. The stability in the uncomplexed state might at least in part be attributed to the presence of a water molecule, which forms hydrogen bonds to Tyr48 and His110 and thus "replaces" the ligand carboxylate. Such a water molecule is observed in both uncomplexed simulations, *no_lig_300K* and *no_lig_350K*. In both cases, the water molecule is very stably maintained in this position and exchanged only twice during the 3 ns simulation time. The dual nature of the binding site composed of a fairly flexible specificity pocket and a comparatively rigid half (formed by the anion-binding site) is thus apparent also in the simulations of the uncomplexed state.

An interesting question is whether conformations sampled in the uncomplexed simulations bear any resemblance to other aldose reductase crystal structures. Limiting the discussion to the three main distinct experimental structures identified above (i.e., 1ads, 1ah3, and 1iei), rmsd measurements of the binding-site residues reveal that this seems actually to be the case. For simulation *no_lig_300K* the trajectory average rmsd with respect to the uncomplexed crystal structure 1ads is 1.34 (± 0.17) Å and thus significantly lower than the value measured

with respect to the IDD594 crystal structure corresponding to $1.55 (\pm 0.25)$ Å. The minimum rmsd with respect to the ligand-free structure (1ads) observed during the trajectory is 0.90 Å, indicating high similarity to this experimental structure of the unbound state. Even in comparison to the tolrestat-bound structure (1ah3), a conformation with a minimum rmsd of 0.99 Å is sampled, but the average rmsd of $1.58 (\pm 0.24)$ Å is higher than the corresponding value for the uncomplexed structure (1ads), which is not unexpected. The least similarity, finally, is observed with respect to the zenarestat-bound structure (1iei): here, the minimum rmsd is 1.17 Å and the trajectory average $1.79 (\pm 0.22)$ Å. As far as simulation *no_lig_350K* is concerned, generally somewhat higher values but analogous trends in the rmsd measurements with respect to IDD594, 1ads, 1ah3, and 1iei are observed.

The rmsd measurements, however, are not to be overinterpreted and should be complemented by qualitative visual inspection and comparison of torsion angles. The important factors determining the size and form of the binding pocket are, in fact, primarily the conformation of the Cys298-Leu300 backbone and the orientation of the Leu300 side chain and differences or similarities in these residues might be masked in the rmsd measurement by other, less important residues with minor effects on the binding site. From visual inspection it turns out, however, that relevant conformations comparable to other experimentally observed conformations are indeed being sampled (e.g., compare Figure 3 and Figure 10). Furthermore, a comparison of the crystal-structure torsion angles listed in Table 4 (side chains of Phe122, Cys298, Leu300, Cys303) with torsion-angle distributions sampled by the two trajectories of the uncomplexed state shows that the distributions cover nearly the entire range of the experimentally observed values. The main exception is Leu300, where the values between -130.0° and -140.6° as well as the value in the tolrestat-bound state (1ah3) of -30.8° is not sampled. As far as the Val297 - Leu300 backbone ϕ - and ψ -angles are concerned, most of the experimental variation is seen in the simulations as well. Taken together, the degree of sampling obtained here using a single X-ray starting structure subjected to different simulations of 3 ns length appears reasonably adequate for the degree of binding-site flexibility anticipated for aldose reductase.

Binding-site flexibility and induced-fit of aldose reductase. The comparative X-ray structure analysis combined with extensive MD simulations provides a fairly consistent picture of flexibility effects and dynamic characteristics of the aldose reductase binding site. First of all, flexibility is clearly mediated by a limited set of residues: most of the mobility is transmitted by only about a third of the 15 binding-site residues. The key role is played by Leu300 and the backbone stretch from Val297 to Leu300. The effects of positional and

conformational variations of this backbone segment are amplified by the Leu300 side chain: backbone motions which *per se* would have only minor effects on the shape of the binding site, lead to significant alterations in its appearance because of modified Leu300 movements. Besides that, this side chain itself exhibits considerable mobility and affects the positions of spatially neighbouring binding site residues, primarily Cys303 and Tyr309 whose positions are correlated with the Leu300 orientation. Among the other residues in the binding pocket, Phe122 and Trp219 show the most significant degree of flexibility; both are located in spatial proximity to the pivotal Leu300. All other binding-site residues are significantly more stable in position and conformation. This applies especially to the catalytic site around the cofactor, Tyr48 and His110. The high stability of this region in the uncomplexed state is fostered by a water molecule which is firmly embedded into a hydrogen-bonding network.

Both the comparative X-ray structure analysis and the MD simulations provide clear evidence for a dual character of the aldose reductase binding site: an area of high structural stability surrounding the catalytic site and a region of high mobility surrounding the Leu300 residue. Based on a thermodynamic stability analysis, such a dual nature of binding sites has recently been proposed as a general and functionally important characteristic of proteins (Luque et al. 2000). Aldose reductase appears to perfectly fit this view, in particular also the observation that catalytic residues are usually located in regions with very high structural stability.

In light of these findings, it is worthwhile to discuss what is generally considered as induced-fit binding of inhibitors to aldose reductase. In the absence of a ligand, the holo-conformation as represented by the uncomplexed structure 1ads seems clearly preferred: different crystal structures of the holo state show only minor differences, and in the MD simulations of the uncomplexed state, holo-like conformations are predominant (even though a complexed conformation was used as starting point!). The conformation seen in the uncomplexed state of the enzyme is frequently also observed in crystal structures with bound ligands; currently, the majority of the aldose reductase structures in the PDB adopts this conformation. Accordingly, this conformation also represents a binding-competent state, and induced-fit is not a necessary condition for ligand binding to aldose reductase. The occurrence of induced-fit does of course also depend on the size and nature of the ligand.

With certain more extended ligands, such as IDD594, zenarestat, or tolrestat, however, a variable specificity pocket is opened. Most likely this opening requires energy and thus contributes unfavorably to the binding free energy. The rare occurrence of protein conformational states suitable for binding of IDD594 or tolrestat in the simulations of the uncomplexed state corroborates this assumption. Thus, in the absence of a ligand, the Leu300-closed state of the specificity pocket is clearly preferred. Nevertheless the overall

energetic cost of the conformational change in the binding site is likely to be moderate because on the one hand the area where it occurs has low structural stability, while on the other hand significant mobility is maintained in the ligand-bound state. Furthermore, any unfavorable contribution to ligand binding is likely to be largely overcompensated by the gain in free energy resulting from desolvation effects and the deep burial of the ligand moiety in the specificity pocket and the specific interactions formed therein (e.g., the stacking with Trp111).

Although the resulting adaptation of the binding site to certain aldose reductase inhibitors is generally referred to with the term induced-fit, it might be more appropriate to think of it as a process of preferential selection of conformations and corresponding shifts of conformational equilibria (Freire 1998; Ma, Kumar et al. 1999). Accordingly, states with an appropriately opened specificity pocket, which in the absence of a ligand are very weakly populated, are preferentially selected by the corresponding ligand because of a local stabilization due to the presence of parts of the ligand. In total, this results in a net gain in free energy compared to other protein conformations in the ensemble. As a result, the conformational equilibrium is shifted towards the binding-competent conformations with open pocket, and the corresponding conformational state becomes predominant and experimentally observable. Based on this view of selection of intrinsic protein conformations, it appears actually reasonable for structure-based drug design techniques to address issues of flexibility and induced-fit analyzing a set of (pregenerated) protein conformations.

Relevance and implications for drug design. Given the aforementioned flexibility effects upon binding of certain ligands, aldose reductase is clearly a complicated target for structure-based design. As a consequence, standard drug design methods based on a single immobilized binding site may yield comparatively low success rates in predicting near-native binding modes because the selected binding pocket is of relevance only for a certain fraction of the virtually screened ligands. As long as complete flexibility of the protein structure cannot be handled in a truly simultaneous or adaptive manner, the currently favored strategy is to use a limited set of different protein conformations and to consider them as possible alternatives in various ways (e.g., (Claussen, Buning et al. 2001)). This set of structures may be either of experimental origin or come from MD simulations. In both cases the question arises whether the selected structures are a) relevant and b) sufficient.

For aldose reductase as a target for future application of such design techniques, the present study suggests some answers to these questions. Clearly, with respect to the data of experimental origin, there is no doubt that the available crystal structures represent relevant

conformations. Nevertheless, the level of detail and the quality of the structural data is not the same for all available structures. While the ultra-high resolution structure of the IDD594 complex represents a nearly ideal case in terms of quality and detail, it is well known that with structures solved at much lower resolution (~ 2.5 Å) caution is sometimes warranted. The probably more important question, however, is, whether the available structures are sufficient to cover the spectrum of potentially binding-competent conformations. In the case of aldose reductase, the answer is clearly no: the presently known, experimentally confirmed structures represent only four major conformations and there is no reason to believe that no further variations are possible. This assumption is supported by the results of the performed MD simulations.

MD simulations are a tool to alleviate this situation through conformational sampling. In the present study, running multiple simulations with varying starting conditions on a nanosecond timescale led to a respectable number of different conformational substates, covering a much larger spectrum of accessible binding site conformations than detectable in presently available crystal structures. In addition, apart from the major conformational states identified via 2D-rmsd and hierarchical cluster analysis, many "intermediate" states are generated. For a first instance of virtual screening based on multiple protein conformations, both the number and the variation of the generated conformations appears fully sufficient. Nevertheless it is also clear that truly complete sampling can hardly be achieved for systems of the size of aldose reductase. Running additional simulations starting from other experimental conformations is the most straightforward way to address this problem, and first steps into this direction have already been undertaken in the context of the present project.

The final question then is, whether the MD generated conformations are not only sufficiently diverse, but also relevant. Apart from the fact that a well-proven, state-of-the-art simulation method and force field has been applied, a variety of observations indicates that the relevance seems to be given also in the present case. First of all, the rms deviations remain within reasonable boundaries during the simulation. In particular, the overall structure is very stably maintained, in agreement with the expectations for this kind of fold. With respect to the binding site, it is fully compatible with experimental data that different degrees of mobility are observed, e.g. a relatively rigid catalytic site and a highly flexible Leu300 region. Comparing the three different trajectories, it is furthermore reasonable that the experimental binding site conformation dominates in the simulation of the complex, whereas, upon removal of the ligand, conformations are sampled that resemble much more the uncomplexed state. Most valuable in the context of sampling for applications of structure-based design is the less obvious and less expected observation that even in the absence of a ligand, conformations can

occur which resemble already known complexed conformations. Such characteristics are most useful if MD simulations are to be applied for conformational sampling of putative binding-site conformations for virtual screening.

4.1.4 Conclusions

Comparative crystal structure analysis and MD simulations based on a new ultra-high resolution crystal structure have been used to probe the binding-site flexibility of aldose reductase. A dual nature of the binding pocket is revealed, characterized by a very stable region surrounding the catalytic site and a highly mobile area around Leu300. This residue itself plays the dominant role in the binding-site adaptations. The conformational substates generated by the simulations are both compatible with and complementary to the conformations observed in currently available crystal structures and should thus prove useful in virtual screening applications. Qualitatively, the results support a view of binding-site adaptations as resulting from preferential selection of binding-competent conformations from the ensemble. The energetic penalty of such adaptations on the overall binding free energy is likely to be small. Further MD studies, virtual screening based on MD-generated conformations, as well as isothermal titration calorimetry and site-directed mutagenesis experiments are currently undertaken to quantify the contributions and to further improve the understanding of the effects of binding-site flexibility on inhibitor design, thermodynamics of ligand binding, and specificity.

4.2 Datenbanksuche basierend auf IDD594-Bindungsmodus²

4.2.1 Introduction

A major goal of any drug development project is the discovery of new prospective leads that are appropriate in shape and chemical constitution (“lead-like”) to be subsequently optimized towards highly active and selective inhibitors of the biochemical pathway under consideration. In parallel, pharmacological studies have to show that modulations along this pathway result in a valid therapeutic principle. Proteomics will provide increasing information about such new pathways and structural genomics will elucidate the 3D structure of the proteins that could possibly serve as targets for therapeutic intervention (James 1997; Kenyon et al. 2002; Page et al. 1999). Are we prepared to find efficiently in short time putative leads for these new targets? One well-established technology is experimental high-throughput screening; however, it has been shown to be rather cost-intensive and of frustratingly low hit rate (Jenkins, Kao et al. 2003; Rishton 1997). As a rather recent complement virtual screening has been introduced (Klebe 2000; Lyne 2002; Schneider et al. 2002; Walters, Stahl et al. 1998). This typical knowledge-driven approach starts with the 3D structure of the target protein, which is exploited to discover new leads by computer searches in large compound libraries. A prerequisite for the success of this method is a detailed understanding of the structural properties of the target protein and the criteria that determine its binding to a ligand. Additionally, its crystal structure in complex with several distinct ligands should help to define the range of possible binding modes. Furthermore, information from structure/activity relationships determined for a series of ligands support a better prediction of the expected binding affinities. The latter entity is of utmost importance since it serves as the ultimate selection criterion for the actual testing of computer-retrieved candidates.

Inhibition of aldose reductase provides a therapeutic mean for the treatment of diabetes. Although administration of insulin can prolong the life of patients, it does not prevent the progression of chronic diabetes resulting in late-onset, debilitating complications that occur in many tissues and affect various sensory organs, such as the nerve system, circulation, and renal excretion. These complications cause retinopathy, cataract, microangiopathy, and neuropathy,

² Das folgende Kapitel wurde zur Veröffentlichung eingereicht und akzeptiert: Oliver Krämer, Isabelle Hazemann, Alberto D. Podjarny, Gerhard Klebe, Ultra-High Resolution Drug Design III: Virtual Screening for Inhibitors of Human Aldose Reductase, *Proteins: Structure, Function and Genetics*

finally progressing to loss of vision, sensory perception, limb function, and premature death. The development of these complications is linked to an excess level of free glucose in the corresponding tissues leading to an enhanced flux of glucose through the polyol pathway. Aldose reductase (AR), together with sorbitol dehydrogenase (SDH), operates along this pathway. Thus, inhibition of aldose reductase provides a possible strategy to prevent the complications of chronic diabetes (Yabe-Nishimura 1998). Accordingly, considerable research effort has resulted in the detailed structural characterization of aldose reductase (Borhani et al. 1992; Calderone et al. 2000; El-Kabbani et al. 1998; Rondeau, Tete-Favier et al. 1992; Urzhumtsev, Tete-Favier et al. 1997; Wilson, Bohren et al. 1992; Wilson et al. 1995; Wilson, Tarle et al. 1993) and in the discovery of a large number of structurally distinct AR inhibitors (Costantino, Rastelli et al. 1999; Costantino, Rastelli et al. 1996; Da Settimo et al. 2001; Donkor et al. 1999; Fresneau et al. 1998; Hanefeld et al. 1995; Inoue et al. 1999; Mylari, Larson et al. 1991; Oka et al. 2000; Sarges and Peterson 1986). Even if a remarkable number of different classes are known, apparently none of these compounds exhibits yet a property profile with sufficient efficacy in clinical trials.

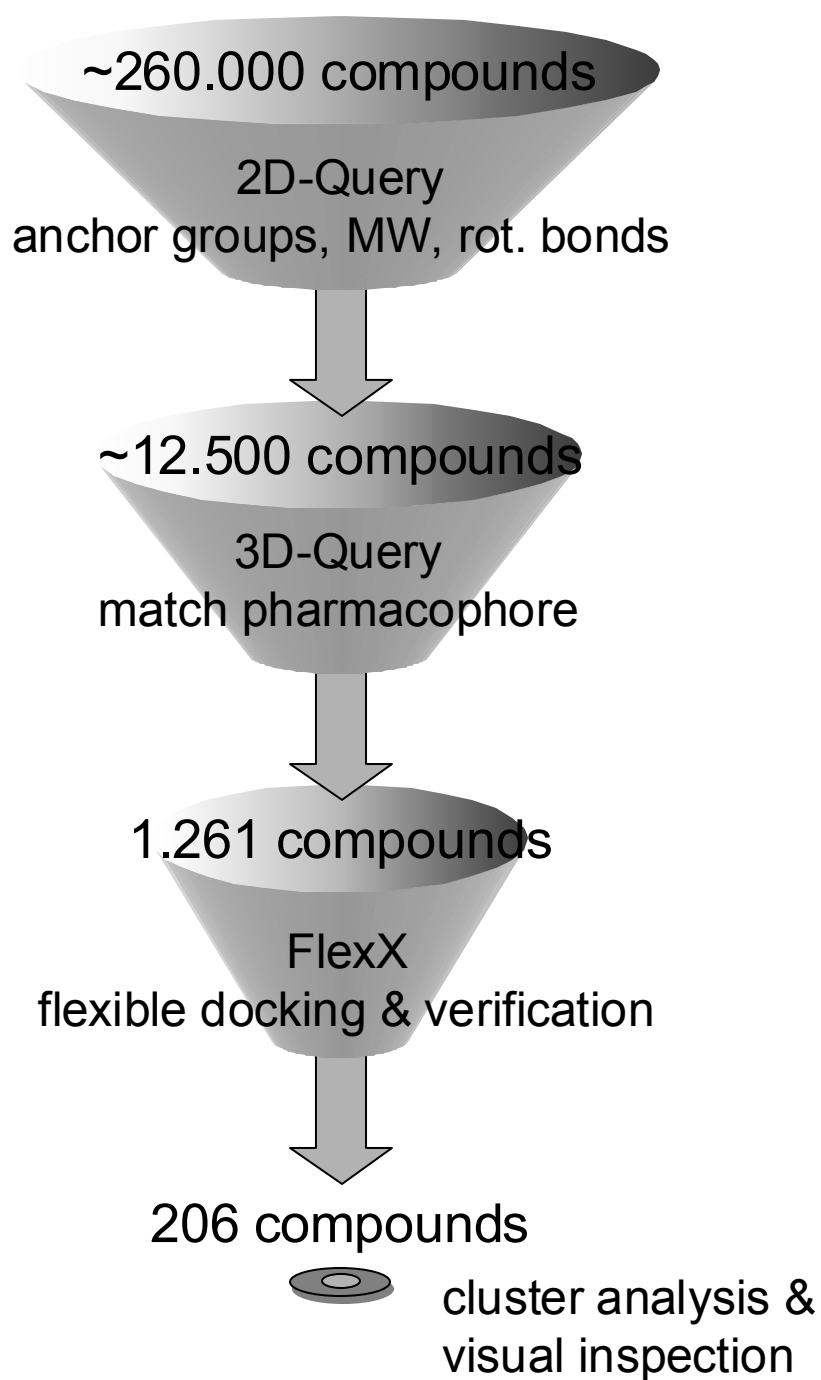
The crystal structures of AR complexes with the inhibitors Tolrestat, Zopolrestat, and Sorbinil show different conformations of the residues in the binding site. While the spirohydantoine-type inhibitor Sorbinil binds to a protein structure conformationally similar to the holo enzyme, the two aromatic acids Tolrestat and Zopolrestat open up distinct new pockets at the protein-binding site. A statistical overview of the data in the PDB has shown that ligand binding frequently induces pronounced structural changes in the geometry of the uncomplexed protein. However, within a series of related ligands binding to the same binding site the protein often exhibits only minor induced-fit adaptations. Obviously, the properties of AR clearly deviate from such a straight-forward, easily predictable behavior. As a consequence, the question, general in computational drug design, can be put forward on how to handle this type of receptor flexibility. More recently, clearly stimulated by detailed crystallographic studies of the pig-lens and subsequently of the human enzyme, several structure-activity relationship studies have been reported (Costantino et al. 2001; Lee, Chen et al. 1998a; Lee et al. 1994; Rastelli et al. 2000; Rastelli and Costantino 1998a; Rastelli et al. 2002a; Rastelli, Costantino et al. 1998b; Rastelli, Vianello et al. 1997; Singh, Malamas et al. 2000). Iwata et al. (Iwata, Arisawa et al. 2001) and Rastelli et al. (Rastelli, Ferrari et al. 2002b) have performed database screenings based on one single conformer of the protein structure. They were able to find AR inhibitors in the micromolar range. While such a strategy is fast and

efficient, it only concentrates on one possible conformer of the binding pocket of AR. It thus ignores other varieties in agreement with the observed binding pocket flexibility.

In this paper, we present a virtual screening based on the ultra-high resolution crystal structure of the inhibitor IDD594 in complex with hAR. Although this approach also clearly limits to one predefined binding pocket, we decided to focus on this structure for the following reasons: (1) IDD594, analog to Zopolrestat, shows high affinity towards AR, (2) similar to the complex structure of Zopolrestat in hAR, whose coordinates are not fully deposited in the PDB, an alternative specificity pocket is occupied by IDD594, (3) the ultra-high resolution gives us exact information about the protonation state of both, the inhibitor and the protein, (4) obviously AR experiences strong binding affinity for this active-site variant suggesting this binding pocket as being optimal for inhibitor design.

In our virtual screening we applied a protocol of consecutive hierarchical filters (Scheme 1). These filters were selected to discover compounds that would fit the binding pocket of IDD594. The initial database comprised about 260,000 test candidates. In the first selection step, putative ligands were chosen that exhibit a functional group to anchor the anion-binding pocket. Subsequently, a pharmacophore model based on the binding geometry of IDD594 and extrapolated from mapping the binding pocket in terms of putative “hot spots” of binding was applied as consecutive filter. In a final filtering step, the remaining candidate molecules were flexibly docked into the binding pocket of IDD594 and ranked according to their predicted DRUGSCORE affinities. After clustering the best scored compounds were subjected to visual inspection. As a proof-of-concept, the most prospective hits from this inspection were acquired and tested for inhibitory activity.

Scheme 1



4.2.2 Data Analysis, Methods and Results

4.2.2.1 Binding Site of the Target Protein

Aldose reductase (AR, EC 1.1.1.21), a member of the aldo-keto reductase superfamily, is a monomeric enzyme that catalyzes the reduction of aldo sugars and a variety of aldehydes to their corresponding alcohols. AR adopts a $(\beta/\alpha)_8$ TIM-barrel fold with the catalytic site located in the barrel center at the bottom of a deep hydrophobic cleft. The enzyme is NADPH dependent and the nicotinamide moiety of the cofactor is largely buried at the bottom of the barrel where it closes up the catalytic center.

Recently, the crystal structure of human Aldose Reductase in complex with the potent inhibitor IDD594 has been determined. (Howard, Sanishvili et al. submitted) In this complex the electron density could be refined using data to a resolution of 0.66 Å, which is the highest resolution yet achieved for a ligand-protein complex of this size. The extraordinary resolution provides new important information with respect to the inhibitor binding site. Most of the protons in the active site can be assigned to the electron density, giving us exact information about the protonation state of the inhibitor and the protein (Figure 11).

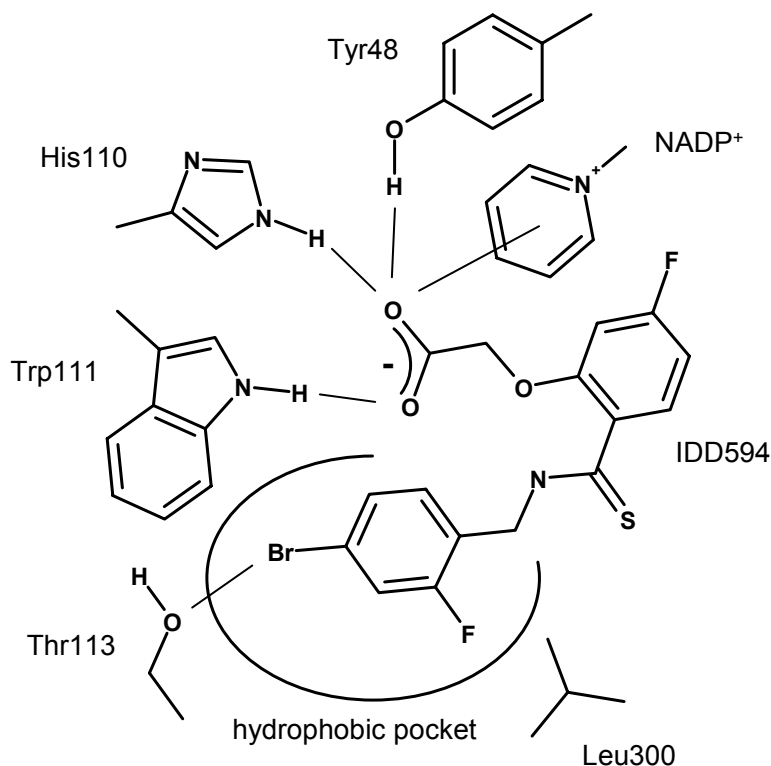


Figure 11. Sketch of the binding mode of IDD594.

The carboxylate group of IDD594 is deprotonated and binds close to the nicotinamide carbon C4 of NADP⁺. Besides this electrostatic interaction, it accepts three hydrogen bonds from the residues Tyr48, His110, and Trp111. They all play an important role in substrate binding along the catalytic pathway. Together with the positively charged nicotinamide ring of the cofactor in its oxidized state, these residues form a pronounced positively charged binding site, the so-called anion-binding pocket.

Similar to other inhibitors, such as Zopolrestat, IDD594 opens up a deep hydrophobic specificity pocket, where its 4-bromo-2-fluoro-benzyl portion is accommodated. This aromatic part of the inhibitor is stacked between Trp111 and Leu300. A special feature not indicated in any of the other previously determined AR structures is the surprisingly short distance of 2.98 Å between the bromine substituent of IDD594 and the oxygen Oγ in the side chain of Thr113. Multipolar refinements (B. Guillot, personal communication) have indicated a mutual polarisation between both atoms, giving evidence for some type of polar interaction.


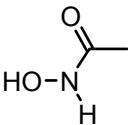
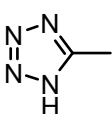
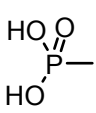
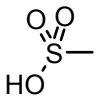
4.2.2.2 Virtual Screening

In the following sections, we will describe the different techniques applied to perform the strategy outlined in the Introduction and the results obtained. All structural handling was performed using SYBYL (2001a) running on a Silicon Graphics O2 (R5000) workstation. Parallel docking was done with FLEXX (Rarey, Kramer et al. 1996a; Rarey et al. 1996b) running on a cluster of Linux PCs.

4.2.2.2.1 Preliminary Filtering for Anion-Binding Pocket Anchor Groups

IDD594 binds with its deprotonated carboxylate to the anion-binding pocket. Accordingly, all candidate molecules were requested to possess one of the terminal functional groups listed in Table 7. These groups have been described in literature as bioisosteres of the carboxylic acid function (Wermuth 1996). Based on this connectivity, we preselected the ACD database (2000) composed of 259,747 entries using UNITY (2001b). In this step, we also applied the criteria defined by Lipinski et al. (Lipinski et al. 1997), additionally we removed all compounds with a molecular weight larger than 350 D and containing more than eight rotatable bonds. This resulted in a reduction of the original dataset to 12,545 entries.

Table 7. Functional groups selected as potential anion-binding pocket anchor groups and their corresponding SLN codes.

Anchor	SLN-code
	C(=O)OH
	C(=O)NH(OH)
	N[1]HN=NN=C@1<v=1>
	P(=O)(OH)OH
	S(=O)(=O)OH

4.2.2.2.2 3D Pharmacophore Query with UNITY

Subsequent to this 2D connectivity search, we performed a 3D search with UNITY based on a predefined pharmacophore hypothesis. This hypothesis was directly extracted from the requirements imposed by the binding site. To highlight those areas of the binding site where a putative ligand can favorably interact with the protein, we applied SuperStar (Verdonk, Cole et al. 2001) and DRUGSCORE (Gohlke et al. 2000a; Gohlke, Hendlich et al. 2000b) as alternative methods.

SuperStar calculates preferred interaction sites in proteins by mapping scatter plots or associated propensity maps derived from composite crystal-field environments observed in the crystal packing of small organic molecules onto active site exposed residues. Accordingly, the SuperStar maps show experimentally observed spatial distributions of contacting groups around one particular central functional group. SuperStar provides the option to switch between the CSD and the PDB as origin of the structural information database (Boer et al. 2001). In this paper, only the CSD-based SuperStar maps have been used.

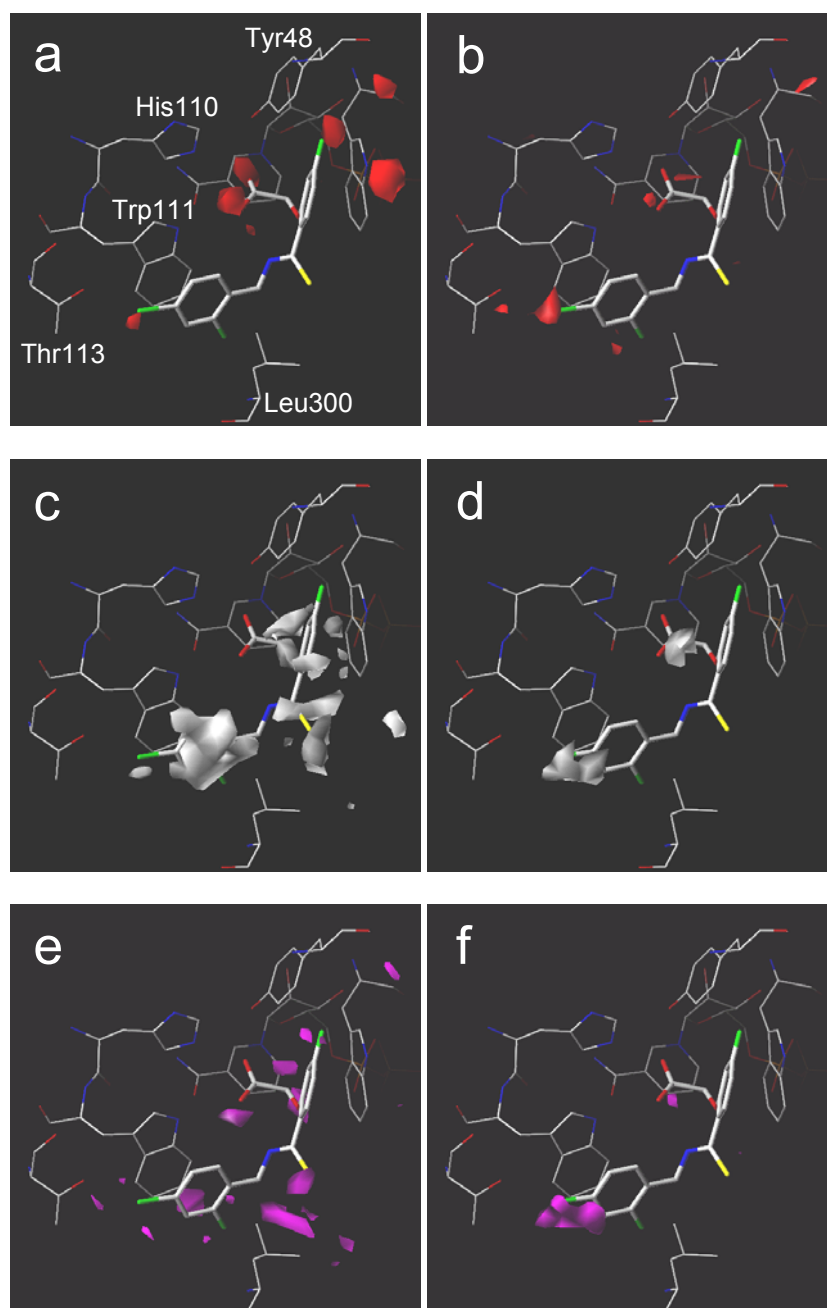


Figure 12. Mapping the “hot spots” of binding in the active site of human AR. To facilitate orientation, the binding geometry of inhibitor IDD594, as determined by crystallography, is also shown. (a) and (b) highlight favorable areas (contour level set to 5% above the global minimum in DRUGSCORE and to a propensity level of 8 in SuperStar) for a hydrogen-bond acceptor group in a putative ligand (red): (a) SuperStar maps using carbonyl oxygen as probe, (b) DRUGSCORE maps using O.2 as probe. (c) to (f) highlight favorable areas for interactions with a hydrophobic group in a putative ligand: SuperStar maps with (c) methyl group (white) and (e) aromatic CH (magenta) as probe, DRUGSCORE maps with (d) C.3 (white) and (f) C.ar (magenta) as probes.

DRUGSCORE is based on a knowledge-based approach. Statistical potentials are derived using the “inverse Boltzmann principle”. The ligand-protein interface is analysed in terms of occurrence frequencies by which a particular ligand atom type is found in contact with a protein atom type. As knowledge base for the analyses, the body of determined protein-ligand complexes is used. To analyze the binding properties of a binding pocket, a regularly spaced grid is imbedded. Subsequently, for different ligand atom types interaction energies are computed by systematically placing these probe atoms to the various grid intersections. As functional form to determine the interactions with the surrounding protein residues the knowledge-based pair potentials of DRUGSCORE have been used. In a final step the obtained grid values are contoured according to a predefined level above the detected global energy minimum.

Using SuperStar, the pocket of hAR was systematically analyzed to detect favorable interaction sites with the following functional groups: C=O (H-bond acceptor), a methyl group, and an aromatic CH group to describe hydrophobic interactions. Using DRUGSCORE, the following probes were applied: O.2 type oxygen (SYBYL atom type notation) as H-bond acceptor, C.3 and C.ar for hydrophobic contacts.

In Figure 12, the binding mode of IDD594 is shown together with the contour maps for an H-bond acceptor (Figure 12a+b). For both methods, the acceptor property is indicated as a strong contour in the region of the anion-binding pocket, where H-bonds are formed with Tyr48, His110, and Trp111. In addition, an interaction with a ligand acceptor atom is predicted next to Thr113. IDD594 places a bromine atom into this region.

In the case of hydrophobic interactions (Figure 12c-f), both methods predict favorable ligand binding regions in an area next to Trp111, Thr113, Phe122, and the loop around Leu300, the so-called specificity pocket, which is occupied by the 4-bromo-2-fluoro-benzyl portion of IDD594. This area seems to be especially favorable for aromatic interactions. Additionally, both methods indicate a favorable hydrophobic region close to the carboxylate of the inhibitor.

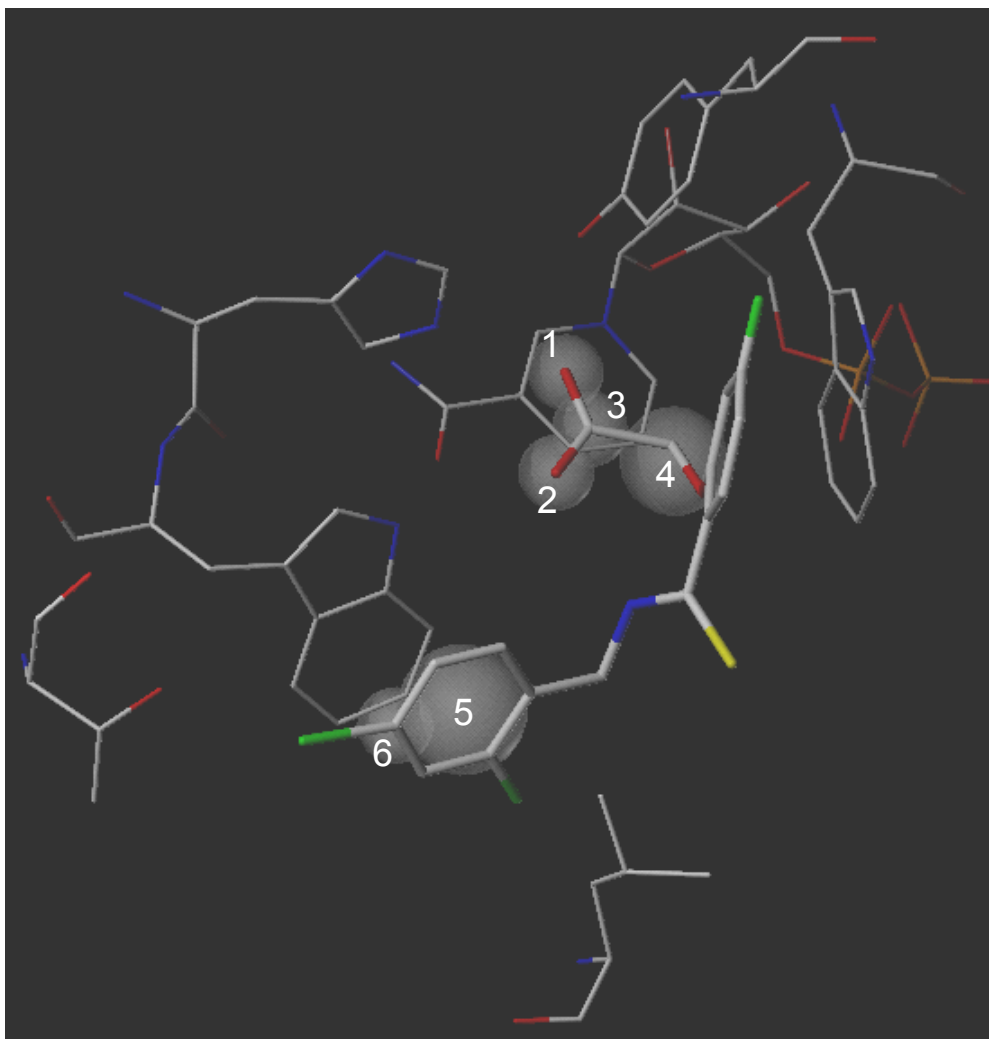


Figure 13. Translation of 'hot spots' indicated in the various maps in Figure 2 into a UNITY pharmacophore hypothesis. To facilitate orientation, the binding geometry of inhibitor IDD594 is also shown. The positions of the pseudocenters correspond to the centers of the "hot spots". Spheres of adjustable size (gray) were assigned to the pseudocenters: (1) acceptor atom (O sp^2 , N sp^2), tolerance 0.7Å, (2) donor atom (selection see text, O in OH group, N in NH group), tolerance 0.7Å, (3) bridging atom requested for the anchor group (carbon atom in carbonic acid, hydroxamic acid, or tetrazole; phosphorous atom in phosphonate, sulphur atom in sulphonate), tolerance 0.7Å, (4) hydrophobic atom (not H), tolerance 1.0Å, (5) atom as member of a hydrophobic moiety, tolerance 1.5Å, (6) atom as member of a 5- or 6-membered aromatic ring, tolerance 0.7Å.

Keeping the experimentally determined protonation state of the inhibitor IDD594 in mind, is important to correctly translate the indicated hot spots for H-bonding properties into a pharmacophore pattern appropriate for the planned database searches. IDD594 binds with its deprotonated carboxylate group into the anion-binding pocket, while carboxylic acids are stored as neutral (protonated) compounds in our precompiled database. Since we can assume that also the carboxylic acid isosteres become deprotonated upon hAR binding, we have to

artificially define a H-bond donor site for our pharmacophore query replacing the H-bond acceptor 'hot spots' in the anion-binding pocket. This procedure assures that candidate molecules will be retrieved in correct protonation states from the precompiled database with protonated compounds.

Translation of the indicated 'hot spots' for hydrophobic interactions is straightforward for both areas, the specificity and the anion-binding pocket. Generic pharmacophore sites were assigned to the geometric centers of the contoured 'hot spots'. No clear cut 'hot spot' is indicated in the region bridging the anion-binding pocket and the specificity pocket.

The accordingly defined pharmacophore model has been submitted to UNITY. It comprises six pseudocenters of deviating spherical tolerances (Figure 13), each assigned to a specific property. Three pseudocenters were used to define the position and orientation of the putative anchor groups. Markush atoms were assigned to these centers: (1) an acceptor atom close to Tyr48 and His110 (sp^2 oxygen atom or sp^2 nitrogen atom), (2) the artificially assigned donor atom close to Trp111 (oxygen atom of an OH group or nitrogen atom of a NH group), (3) a bridging atom to further define the anchor group (carbon atom in carboxylic acid, hydroxamic acid, or tetrazole; phosphorous atom in phosphonate, sulphur atom in sulphonate).

One sphere (5) was assigned to describe the region favorable for hydrophobic interactions inside the specificity pocket, a second sphere (4) was placed close to the anion-binding pocket. An additional sphere (6) was located adjacent to sphere (5) demanding for a five- or six-membered aromatic ring to be placed in the specificity pocket.

Based on this query, a residual set of 1261 compounds was retrieved. Among these hits, nearly 97% of the considered molecules contained a terminal carboxylic acid group. None of the hydroxamic acids or tetrazoles were retrieved.

4.2.2.2.3 *Final Docking with FLEXX*

In a final step, the remaining 1261 hits from the UNITY search were docked into the binding pocket of hAR (taking the coordinates from the complex structure with IDD594 as reference) using FLEXX. Prior to docking, all groups anchoring to the anion-binding pocket were deprotonated using a shell script. Docking solutions were ranked by their predicted binding affinity using DRUGSCORE. Only the best scored binding mode of each compound was further considered in the following steps.

In a validation step it was assessed, whether this best scored FLEXX docking solution suggests the compound to be accommodated in a way that the previously defined pharmacophore has been satisfied. In this step, a reduced UNITY pharmacophore, consisting of the three previously described pseudocenters (1), (2), and (5) only (Figure 13), has been considered. This assessment further reduced the dataset to 206 compounds. Among them were five sulphonates. None of the retrieved phosphonates was suggested to bind in agreement with the pharmacophore.

The impact of the molecular weight on compound selection has been mentioned in previous studies (Muegge et al. 1999; Pegg et al. 2001). A significant dependency of DRUGSCORE on the molecular weight has been observed in our lab (Silber 2002). With increasing size of the candidate molecules DRUGSCORE adds an increasing number of contributions of the pair potentials. This fact can easily exaggerate the affinity estimate of docking solutions of larger candidate molecules. Pan et al. proposed a normalization strategy based on the total number of heavy atoms to obtain a less biased ranking of molecules of deviating size in a relative comparison (Pan et al. 2002). We decided to use the molecular weight and the number of rotatable bonds as descriptors to scale the relative scoring of retrieved compounds. The score finally used for ranking was calculated by dividing the squared DRUGSCORE contribution by the product of the molecular weight times the number of rotatable bonds (equation 1):

$$\text{equation 1} \quad \text{Score} = \frac{(\text{DrugScore})^2}{(\text{MW}) * (\text{No. rot. bonds})}$$

A first visual inspection of the proposed binding modes generated by FLEXX revealed that many carboxylic acids with similar topology were found among the best scored hits. To concentrate on the best scored compounds (the top two thirds) we selected carboxylic acids with a score better than the overall top score times 0.33 and clustered the remaining 120 compounds with respect to their UNITY 2D fingerprints. Using the Jarvis-Patrick clustering scheme, as implemented in SYBYL, 40 clusters were produced. The best scored compound from each such cluster was subjected to further visual inspection. In this visual inspection we critically assessed the suggested binding conformation, the mutual surface complementarity of ligand and protein and the possible presence of unfilled space along the protein-ligand interface.

Finally, a subset of 9 carboxylic acids was selected for acquisition and subsequent biological testing.

4.2.2.3 Biological Testing

4.2.2.3.1 *Overproduction and purification of recombinant hAR*

The ORF of the hAR gene (Accession GenBankTM/EMBL Data Bank Number J05017) was amplified by PCR from its cDNA and cloned into the T7 RNA polymerase-based vector pET15b (Novagen). Expression of the (his)₆-hAR in the *E. coli* strain BL21(DE3) (Novagen) is induced by IPTG (Euromedex) during a 3 hours culturing at 37°C. The pellets from a 4 liters culture were disrupted by sonication and centrifuged. The supernatant was applied on a TALON metal affinity column (Clontech). After thrombin cleavage of the hexahistidine extension, the detagged protein was loaded on a DEAE Sephadex A-50 column (Pharmacia) and eluted with a NaCl gradient.

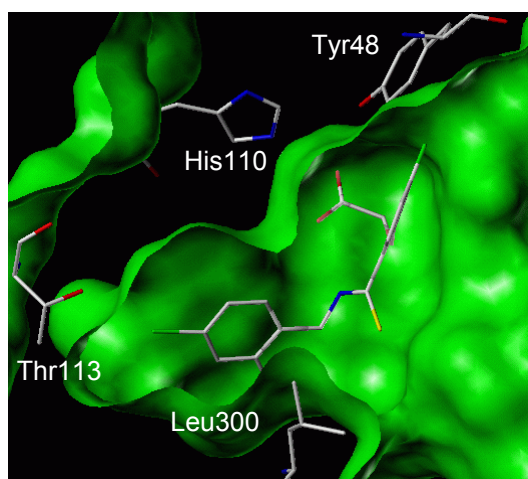
4.2.2.3.2 *Photometric determination of inhibitory activity*

Human AR was purified as described above. The in vitro inhibitory activity of the candidate molecules was determined by recording the decrease in the oxidation ratio of NADPH. The absorbance at 340nm was monitored at 25°C with a BMG plate reader. The assay was performed at 25°C in a 250µL reaction mixture of 100mM sodium phosphate buffer (pH 6.2) which contained 0.14mM NADPH, 26.5mM D-xylose as substrate, and 0.28µM human AR enzyme. The test compounds were assayed for their inhibition of AR at concentrations from 0.8mM to 20nM. GraFit software (1989-1999) was used to obtain the IC₅₀ values (Table 8).

Table 8. Scoring values, predicted and experimentally determined IC₅₀ values for the 9 compounds discovered by virtual screening and selected for testing with hAR.

no.	label (database)	MW	no. rot. bonds	DrugScore (*10 ⁻³)	score [#]	IC ₅₀ (pred.)* [μM]	IC ₅₀ [μM]
1	BTB02809 (Maybridge)	277.24	5	-420	127	5.6	2.4±0.5
2	JFD00882 (Maybridge)	271.20	4	-412	156	11.7	4.1±1.0
3	3H-395S (Bionet)	224.25	5	-424	160	20.4	13.0±3.9
4	2D-111 (Bionet)	233.26	4	-402	173	24.5	15.5±4.5
5	4E-334S (Bionet)	314.26	4	-427	145	13.5	16.7±3.4
6	DP01177 (Maybridge)	247.23	5	-439	156	9.5	64.3±11.3
7	MWP00297 (Maybridge)	295.33	4	-537	244	0.2	>500
8	PD00723 (Maybridge)	273.44	5	-435	138	3.7	>500
9	11F-915 (Bionet)	280.32	3	-498	295	0.6	>500

[#] Score computed according to equation 1. * IC₅₀ values have been calculated based on the DRUGSCORE values using the scaling coefficient, which has been determined as average over scaling factors obtained for data sets of serine proteases, metallo proteases, endothiapepsines, and two mixed data sets (Gohlke et al. 2002b).



a) IDD594

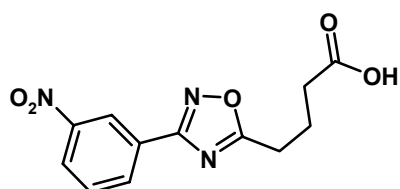
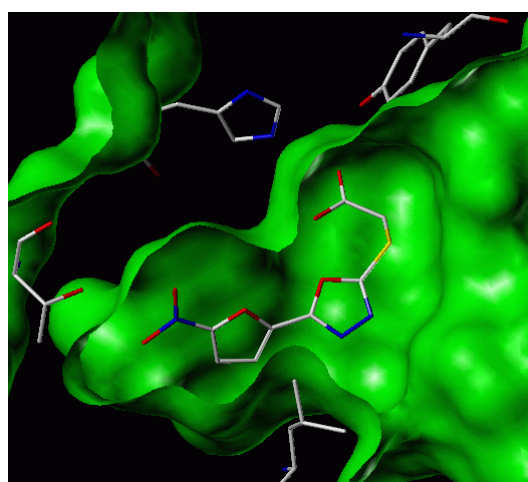
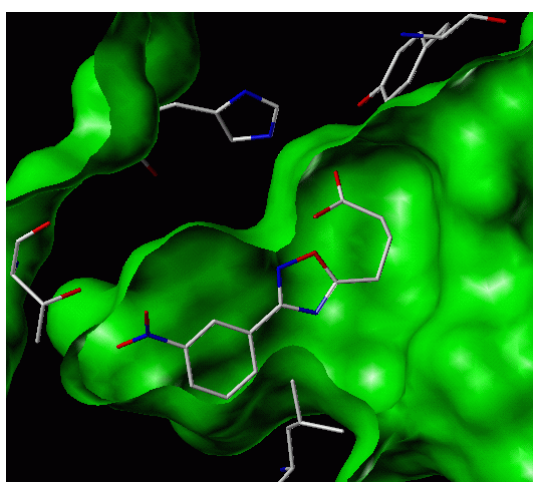
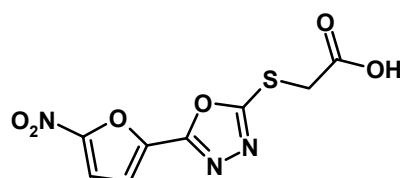
b) BTB02809, $IC_{50} = 2.4 \pm 0.5 \mu M$ c) JFD00882, $IC_{50} = 4.1 \pm 1.0 \mu M$

Figure 14. Suggested binding mode of the two hits BTB02809 (b) and JFD00882 (c), as obtained by docking into the binding pocket of IDD594 (a) using FLEXX and the scoring with DRUGSCORE. The shape of the binding pocket is represented by the solvent accessible surface (green), parts clipped off for clarity.

4.2.3 Discussion

In this paper, we present a strategy for the computer screening of large compound libraries to obtain a limited set of prospective hAR inhibitors. Our approach successfully retrieved a set of prospective hits of which 9 were tested by enzyme kinetics. All of these compounds exhibited a carboxylic acid as anion-binding pocket anchor. This reflects the results of our initial search, when at an early stage the 3D pharmacophore hypothesis limited already 97% of the retrieved compounds to carboxylic acids. The finally performed assay showed that 6 out of 9 tested compounds exhibited activity with IC_{50} values in the micromolar range.

In a recent review on virtual screening, Schneider and Böhm (Schneider and Böhm 2002) mentioned that “all docking programs and scoring functions have a tendency to generate a significant number of false positives” and that “different scoring functions work better for different protein-ligand complexes”. In the present virtual screening study a hit rate of 66% is achieved considering only inhibitors with $IC_{50} < 100 \mu M$. Therefore, DRUGSCORE seems to be an appropriate scoring function for the discovery of aldose reductase inhibitors. This is further exemplified by the fact that the IC_{50} values of all active compounds are predicted correctly within one logarithmic unit (Table 8 and Figure 15).

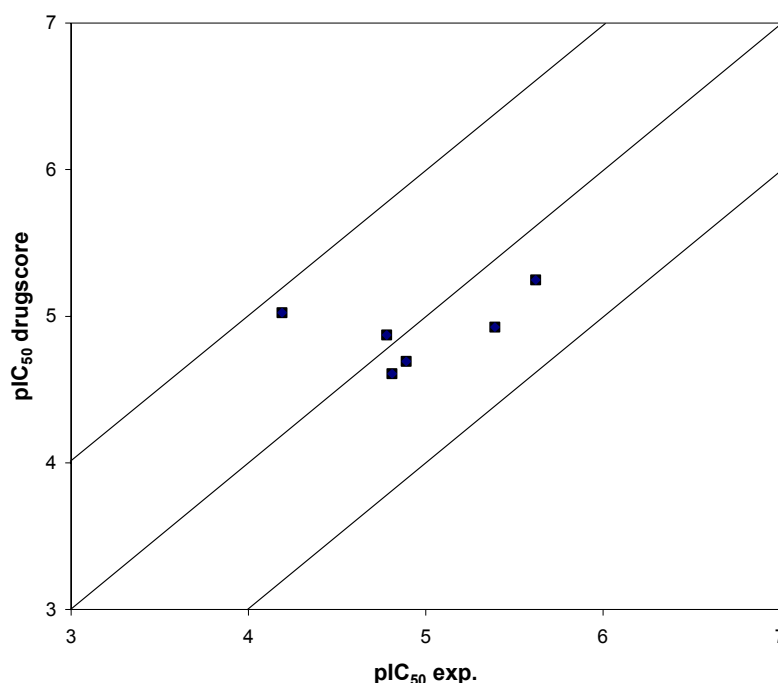


Figure 15. Plot of experimental and DRUGSCORE predicted IC_{50} values taken from Table 8.

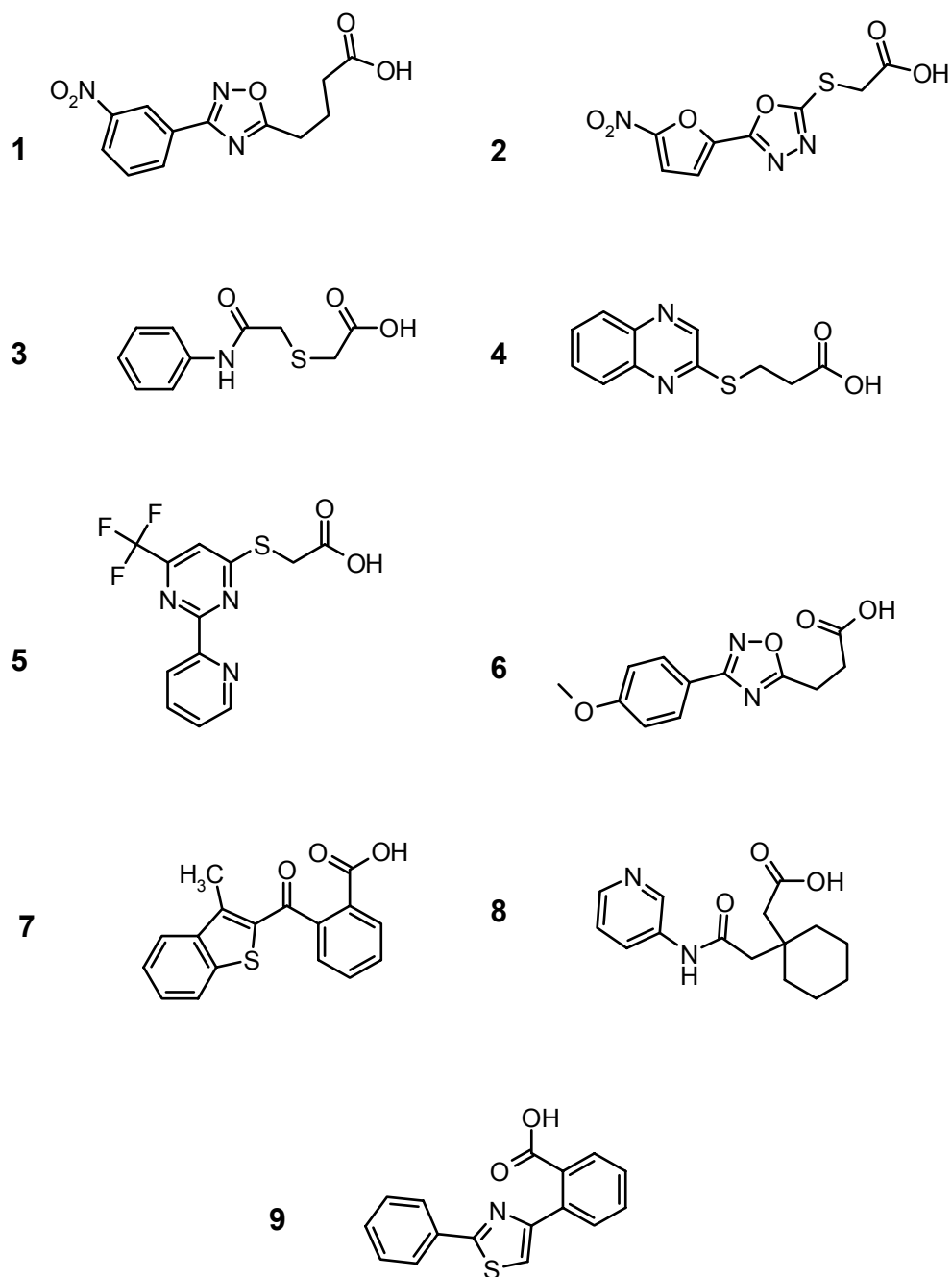


Figure 16. Chemical formulae of potential ARIs discovered by virtual screening.

In the first successful example of the discovery of novel potent inhibitors of AR following a database search, Iwata et al. (Iwata, Arisawa et al. 2001) could identify 7 ARIs in the micromolar range with a hit rate of 20%. They used the program ADAM&EVE to dock compounds from the ACD into the binding pocket of AR extracted from the complex structure with Glucose-6-phosphate (PDB code 2acq). In their database screening, Rastelli et al. (Rastelli, Ferrari et al. 2002b) were able to discover inhibitors from other chemical classes including sulfonic acids, nitro derivatives, sulfonamides and carbonyl derivatives. They used the program DOCK to place molecules from the NCI database into a previously energy minimized structural model of AR. Similarly to Iwata et al., they did not apply additional filter steps and achieved a hit rate of ~20%. The higher hit rate achieved in our study compared to the previous studies can be attributed to the more restrictive search criteria applied. Trade-off for this rather satisfying hit rate is the sole retrieval of carboxylic acids as AR inhibitors. However, applying a very similar strategy, we could succeed with even higher hit rates for carbonic anhydrase (Grüneberg, Stubbs et al. 2002) and tRNA-guanine-transglycosylase (Brenk et al. 2003; Meyer et al. 2002).

Nevertheless, it has to be mentioned that also a few false positives appeared in our retrieval. Our approach is not entirely capable to discriminate true hits from non-binders (compounds **7** - **9**). Can we collect some evidence to explain these findings? Obviously, the non-binders are less flexible than the true hits (Figure 16), e.g. in compound **7** and **9** the carboxylate group is directly connected to an adjacent phenyl ring, whereas in IDD594 there is a oxymethylene spacer between the carboxylate group and the aromatic ring. Our pharmacophore hypothesis comprises two main anchoring points for inhibitors in the hAR active site. One is the anion-binding pocket where the carboxylate group binds, the second coincides with an area in the hydrophobic specificity pocket where aromatic ring systems are stacked between Trp111 and Leu300. The lack of affinity of **7** and **9** might be attributed to the conformationally restricted bridge between the carboxylate group and the terminal aromatic moiety not allowing for optimal placement of both anchoring groups. In the case of compound **8** an unbalanced H-bond inventory might be responsible for the non-detectable binding affinity. The NH and C=O of the amide group and the pyridine nitrogen are likely to be involved in hydrogen bonding in aqueous solution prior to complex formation. However, in the suggested binding mode all functional groups become desolvated and do not find an appropriate H-bonding partner at the binding site to compensate for this loss in the overall H-bonding inventory.

The aim of the study was to identify lead compounds which are able to bind to hAR with a binding mode similar to that of IDD594. As a subsequent step, the suggested binding modes

have to be confirmed by crystallography. However, first trials to co-crystallize the discovered hits with human AR have not been successful yet.

Can we expect the database compounds to have similar inhibitory activity as IDD594? We discovered inhibitors in the micromolar range, the best inhibitors possessing IC_{50} values of 2.5 μ M and 4.0 μ M. Accordingly, they are much weaker binders compared to IDD594. This is not surprising, since our filter steps were set such to select lead-like compounds, which, due to their reduced size, can only form a reduced number of contacts to the target protein and thus exhibit weaker activity (Oprea et al. 2001).

As mentioned before, there is evidence for an interaction between the Br atom of IDD594 and the oxygen of Thr113. This interaction has been identified as a key feature for the specific inhibition of hAR by IDD594 (Howard, Sanishvili et al. submitted). The generated docking solutions suggest that the two micromolar inhibitors BTB02809 and JFD00882 place a nitro group next to Thr113 in an orientation rather similar to the Br atom (Figure 14). This indicates a possible interaction between these nitro groups and Thr113. Further testing has to show whether the new inhibitors are specific hAR inhibitors.

4.2.4 Conclusions

The present study is the first successful example of a virtual screening of inhibitors for hAR based on the crystal structure determined with a potent and specific AR inhibitor. Applying a number of consecutive hierarchical filters, the ACD database was screened using the conformation of AR adopted in the complex with IDD594. This search resulted in the discovery of 6 inhibitors with IC_{50} values in the micromolar range. Considering the rather small number of 9 compounds selected for testing a hit rate of 66% of active compounds demonstrates the high success rate of our approach.

4.3 Datenbanksuche unter Berücksichtigung multipler Bindungsmodi

Wie in Kapitel 1.1 beschrieben, dient als Startpunkt für eine virtuelle Datenbanksuche die 3D-Struktur des Ziel-Proteins, da das Verständnis der strukturellen Eigenschaften des Ziel-Proteins eine wesentliche Voraussetzung für den Erfolg dieses Ansatzes ist. Bei der Mehrheit der bislang publizierten Arbeiten wurde dieser Ansatz bei Proteinen mit rigiden Bindetaschen, deren Form sich bei der Ligandbindung nicht verändert, angewendet. Da die Bindetasche der Aldose Reduktase eine ausgeprägte Flexibilität zeigt (Kapitel 3.2), weicht sie deutlich von einem solchen, einfach vorzusagenden Verhalten ab.

Nachdem die in Kapitel 4.2 beschriebene Datenbanksuche auf eine der experimentell beobachteten Proteinkonformationen der Aldose Reduktase beschränkt worden war, soll nun untersucht werden, inwieweit es möglich ist, die Flexibilität des Rezeptors bei der virtuellen Suche nach neuen Inhibitoren der Aldose Reduktase zu berücksichtigen. Im Laufe der letzten Jahre sind erste Methoden entwickelt worden, um die Rezeptorflexibilität im Rahmen des Molecular Modeling zu berücksichtigen (Carlson 2002a; Carlson 2002b; Carlson and McCammon 2000; Halperin, Ma et al. 2002), wobei die verschiedenen Ansätze von der Berücksichtigung verschiedener Seitenketten-Konformationen hin bis zu der Simulation der Bewegung von ganzen Domänen reichen. Da zu Beginn dieser Arbeit keine dieser Rezeptor basierenden Methoden zur Verfügung stand, wurde ein Ligand basierender Ansatz gewählt.

4.3.1 *Ligand basierender Ansatz*

Gemäß dem von Erwin Fischer postulierten „Schlüssel-Schloss-Prinzip“ ist ein Ligand ein Abbild des Rezeptors, an den er bindet. Nach der in Kapitel 1.2 vorgestellten Theorie zum Auftreten unterschiedlicher Proteinkonformationen bei der Bindung verschiedener Liganden (*induced-fit*), selektiert jeder Ligand die für seine Bindung günstigste Proteinkonformation. Dementsprechend sollte es möglich sein, durch die Vereinigung mehrerer Liganden, deren verschiedene Bindungsmodi bekannt sind, zu einem Abbild der entsprechenden Proteinkonformationen zu kommen. Die Auswahl der Liganden sollte so erfolgen, dass die Vielzahl möglicher Proteinkonformationen und damit die Flexibilität des Rezeptors ausreichend repräsentiert werden.

Die Komplexstrukturen der Aldose Reduktase mit Sorbinil, Tolrestat und Zopolrestat zeigen abweichende Konformationen der Aminosäuren in der Bindetasche (vgl. Kap. 3.2 und 4.1). Während der Inhibitor vom Spirohydantoin-Typ Sorbinil an das im Vergleich zum Holo-Enzym nahezu unveränderte Protein bindet, besetzen die beiden Carbonsäuren Tolrestat und Zopolrestat hydrophobe Spezifitätstaschen, die im Holo-Enzym nicht ausgebildet sind.

Allerdings treten auch für die beiden letzteren Inhibitoren Unterschiede im Bindungsmodus der aromatischen Baugruppen auf.

Für die im Anschluss beschriebene Suche nach neuen Inhibitoren der Aldose Reduktase wurden die Inhibitoren Sorbinil, Tolrestat und Zopolrestat unter Beibehaltung aller Atome zu einer Referenzstruktur vereinigt. Im Rahmen der Datenbanksuche wurden dann die Kandidatenmoleküle aus der Datenbank paarweise mit dem Programm SEAL (Klebe et al. 1994) auf diese Referenz überlagert. Das Konzept ist in Abbildung 11 dargestellt.

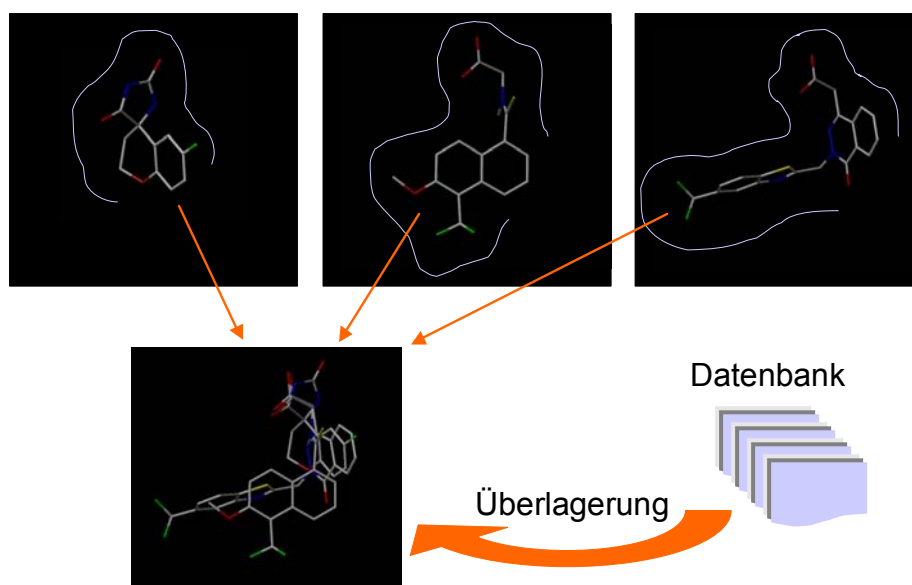
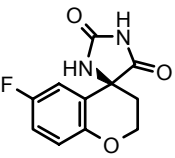
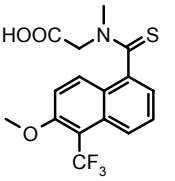
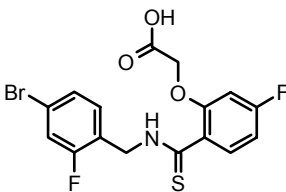
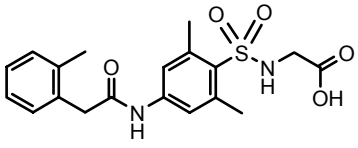
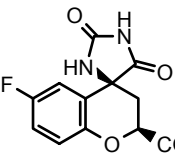
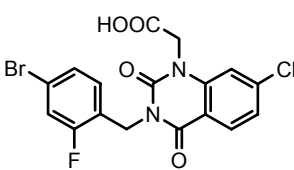
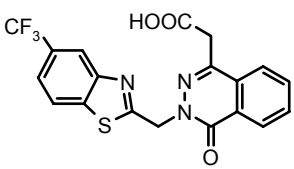


Abbildung 11. Konzept der Ligand basierenden Datenbanksuche.

Das Programm SEAL verwendet Gauss-Funktionen zur Repräsentation der physikochemischen Eigenschaften der zu überlagernden Moleküle. Eine Vereinigung unter Beibehaltung aller Atome entspricht in dieser mathematischen Darstellung einer logischen Oder-Verknüpfung der physikochemischen Eigenschaften. Bereiche, in denen alle vereinigten Moleküle gleiche physikochemische Eigenschaften zeigen, werden hervorgehoben. Die Verwendung der vereinigten Inhibitoren Sorbinil, Tolrestat und Zopolrestat als Referenz für die SEAL-Überlagerung impliziert demnach die Erstellung eines Pharmakophors.

Vor der Verwendung im Rahmen der Datenbanksuche (s. nächster Abschnitt), wurde zunächst getestet, ob der Ansatz in der Lage ist, experimentell beobachtete Bindungsmodi zu reproduzieren. Dazu wurde ein Testdatensatz aus Verbindungen, deren Komplexstrukturen mit Aldose Reduktase bekannt sind, zusammengestellt (s. Tabelle 5).

Tabelle 5. Verbindungen des Testdatensatzes. Angegeben sind der Name der Verbindung, die Strukturformel und der PDB-Code der entsprechenden Kristallstruktur.

Name	Strukturformel	PDB
Sorbinil		1ah0
Tolrestat		1ah3
IDD594		Unveröffentlicht
IDD384		1el3
Fidarestat		1ef3
Zenarestat		1ei
Zopolrestat		1mar

Jede Verbindung des Testdatensatzes wurde paarweise auf die Referenzstruktur überlagert. Die rms-Abweichungen zwischen den von SEAL berechneten Lösungen und dem kristallographisch bestimmten Bindungsmodus wurden berechnet. In Tabelle 6 sind die Werte für die (anhand des Ähnlichkeitsmaßes) als am besten bewertete Lösung und die Lösung mit der kleinsten rms-Abweichung angegeben.

Tabelle 6. Berechnete rms-Abweichungen (in Å) zwischen den kristallographisch bestimmten Konformationen und den mit SEAL erhaltenen Lösungen. Sowohl die rms-Abweichung für die Lösung auf Rang eins (höchstes Ähnlichkeitsmaß) als auch für die beste Lösung (mit der kleinsten Abweichung) sind angegeben. Die Verbindungen des Testdatensatzes wurden auf die vereinigten Inhibitoren Sorbinil, Tolrestat und IDD594 überlagert.

Inhibitor	Rang 1	Beste Lösung	
	rmsd [Å]	rmsd [Å]	Rang
Sorbinil	0,94	0,94	1
Tolrestat	0,50	0,50	1
IDD594	1,49	1,49	1
IDD384	8,92	8,09	6
Fidarestat	1,62	0,75	3
Zenarestat	1,61	0,59	2
Zopolrestat	0,94	0,84	2

Es zeigt sich, dass SEAL für alle Inhibitoren, mit Ausnahme des Inhibitors IDD384, bereits auf Rang eins eine Lösung findet, die um weniger als 2 Å von dem experimentellen Bindungsmodus abweicht. Zudem findet sich die Lösung mit der geringsten rms-Abweichung in drei von sieben Fällen auf Rang eins.

Bei dem Inhibitor IDD384 werden die Grenzen des Ansatzes deutlich. Der experimentelle Bindungsmodus von IDD384 kann nicht reproduziert werden. Der Grund dafür ist, dass kein Stellvertreter für diesen Bindungsmodus in der vereinigten Referenzstruktur enthalten ist. Ohne dass dieser von den anderen drei Liganden völlig abweichende Bindungsmodus in der vereinigten Referenzstruktur aufgenommen wird, kann der SEAL-Überlagerungsansatz keine sinnvolle Lösung liefern. Dies ist in Abbildung 12 veranschaulicht. Die Betrachtung der von SEAL am besten bewerteten Überlagerung von IDD384 mit der Referenz zeigt, wie wichtig es ist, folgende Kriterien zu überprüfen:

- Korrekte Orientierung der terminalen funktionellen Gruppe in der Anionen-Bindetasche, um Ausbildung der essentiellen Wasserstoffbrückenbindungen (zu Tyr48, His110 und Trp111) zu ermöglichen.
- Vermeidung ungünstiger (intramolekularer) Torsionswinkel.

Wie bei IDD384 leicht zu erkennen ist, kommt es zur Einstellung ungünstiger Torsionswinkel, wenn das zu überlagernde Molekül eine größere räumliche Ausdehnung hat als die Referenz.

Um solche Schwierigkeiten einzudämmen, wurde bei der folgenden Datenbanksuche das maximal zulässige Molekulargewicht der Datenbankverbindungen begrenzt.

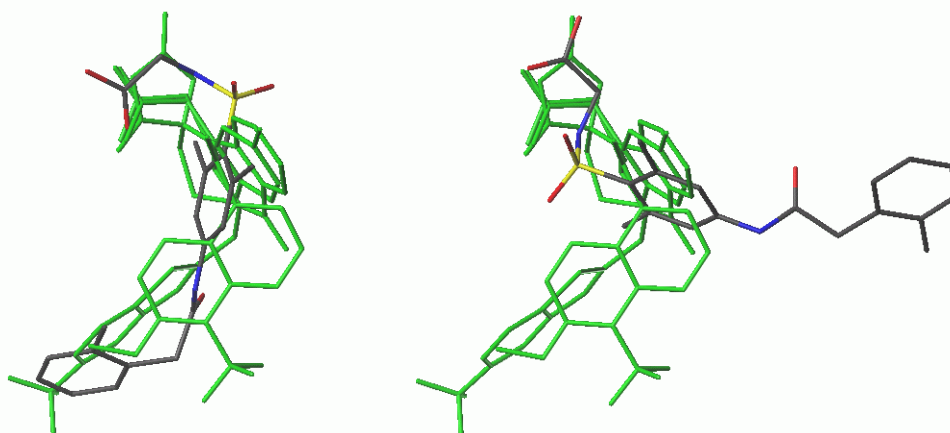


Abbildung 12. Links: SEAL-Überlagerung des Inhibitors IDD384 (gefärbt nach Atomtypen) auf die zur Referenz vereinigten Inhibitoren Sorbinil, Tolrestat und Zopolrestat (grün). Gezeigt ist die am besten (höchstes Ähnlichkeitsmaß) bewertete Konformation. Rechts: Kristallographisch bestimmter Bindungsmodus des Inhibitors IDD384 (gefärbt nach Atomtypen). Zum Vergleich ist auch die Referenz (grün) gezeigt.

4.3.2 Durchführung der Datenbanksuche

Alle bekannten AR-Inhibitoren besitzen eine polare funktionelle Gruppe, die in der Lage ist, in die Anionen-Bindetasche, die von Tyr48, His110, Trp111 und dem Kofaktor NADP⁺ ausgebildet wird, zu binden. Dementsprechend wurde von den Kandidatenmolekülen verlangt, eine der folgenden terminalen funktionellen Gruppe aufzuweisen: Carbonsäure, Säureamid oder Hydantoin. Mit UNITY wurde anhand dieses Konnektivitäts-Kriteriums die Maybridge Datenbank mit etwa 60.000 Molekülen durchsucht. Zusätzlich wurden mit dem SYBYL-Modul SELECTOR alle Verbindungen mit einem Molekulargewicht > 350 D und mehr als vier drehbaren Bindungen entfernt.

Mit den etwa 2700 Verbindungen, die diese Anforderungen erfüllten, wurde im Anschluss eine flexible 3D-Suche mit UNITY durchgeführt. Aufgrund der konformativen Flexibilität der AR-Bindetasche wurde eine Pharmakophor-Hypothese aus der Überlagerung der Inhibitoren Sorbinil, Tolrestat und Zopolrestat abgeleitet. Die verwendete UNITY-Suchanfrage ist in Abbildung 13 dargestellt. Die alternative Besetzung der verschiedenen Spezifitätstaschen, wurde durch Verwendung der *partial match*-Option in UNITY berücksichtigt. Dabei wird die Besetzung nur einer der beiden hydrophoben Sphären **5** und **6** des UNITY-Pharmakophors

verlangt. Um des Weiteren Überschneidungen mit dem Protein zu vermeiden, wurden eine Reihe verbotener Bereiche (*excluded volumes*) definiert, die die Solvens-zugängliche Oberfläche der Aldose Reduktase im Bereich der rigiden Anionen-Bindetasche nachahmen.

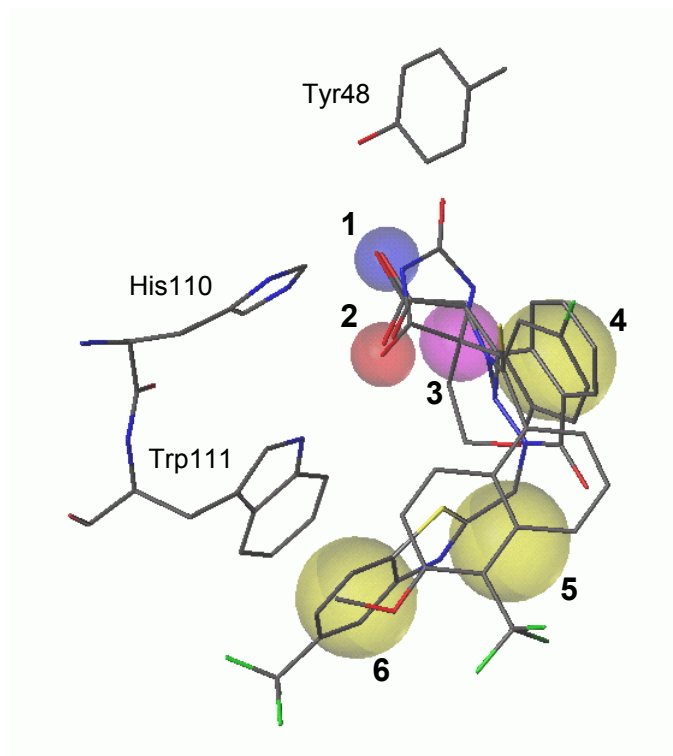


Abbildung 13. Ligand basierende Pharmakophor-Hypothese. Die überlagerten Inhibitoren Sorbinil, Tolrestat und Zopolrestat sowie einige Aminosäuren des Proteins sind zur Verdeutlichung dargestellt. Sphären variabler Größe, entsprechend der Suchtoleranz, wurden den verschiedenen Pseudozentren zugewiesen. Donorgruppen (1, NH oder OH, Toleranz 0,7 Å) sind blau eingefärbt, Akzeptorgruppen (2, C=O, Toleranz 0,7 Å) rot. Hydrophobe Gruppen (4-6, Toleranz 1,5 Å) sind gelb markiert, wobei die Sphären 5 und 6 alternativ zu besetzen sind. Innerhalb der Sphäre 3 (Toleranz 1,0 Å) wird ein Nicht-Wasserstoff-Atom verlangt (C, N, P, O oder S).

In der Folge wurden die verbliebenen 150 Verbindungen paarweise mit SEAL flexibel auf die zur Referenz vereinten Inhibitoren Sorbinil, Tolrestat und Zopolrestat überlagert. Die vorgeschlagenen Lösungen wurden anhand des Ähnlichkeitsmaßes in eine Reihenfolge gebracht. Für die jeweils am besten bewertete Lösung wurde überprüft, ob die jeweilige terminale funktionelle Gruppe im Einklang mit dem zuvor definierten Pharmakophor in der Anionen-Bindetasche platziert wurde (nur die Sphären 1 und 2 wurden verwendet). Abbildung 14 gibt einen Überblick über den Ablauf der Datenbanksuche.

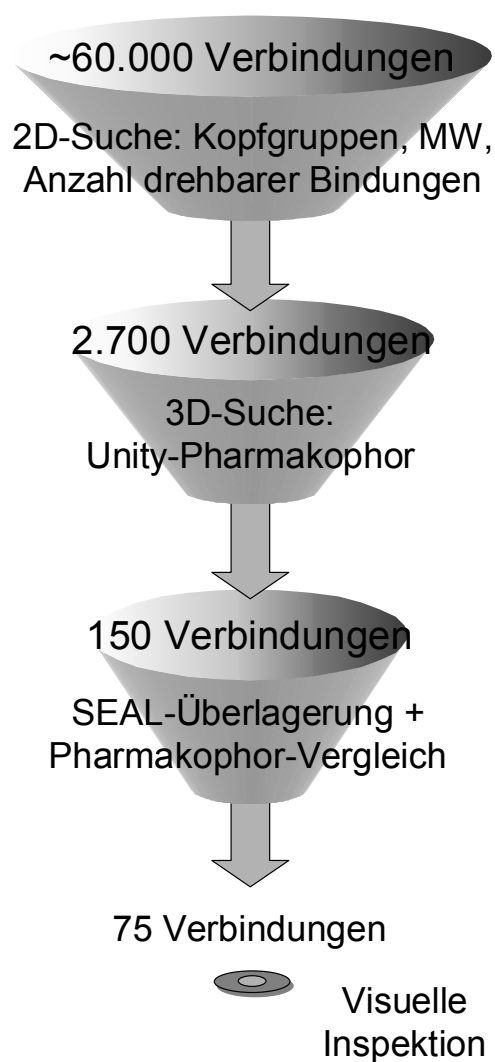
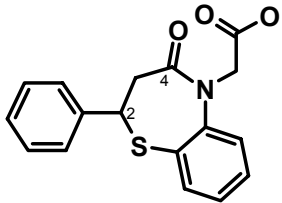
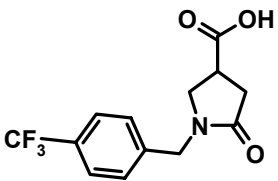
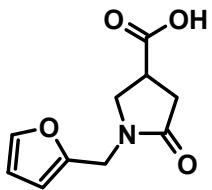
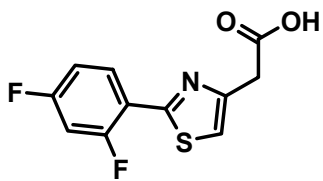


Abbildung 14. Schematische Darstellung des Ablaufs der virtuellen Datenbanksuche.

Nach visueller Inspektion der verbliebenen 75 Verbindungen wurden schließlich vier Verbindungen käuflich erworben und auf ihre Affinität überprüft. Tabelle 7 zeigt die getesteten Verbindungen und die entsprechenden IC_{50} -Werte.

Tabelle 7. Strukturformeln und experimentell bestimmte IC_{50} -Werte der vier Verbindungen, die bei der Datenbanksuche entdeckt wurden.

Bezeichnung	Strukturformel	IC_{50} [μ M]
RJC00316		$18,0 \pm 2,5$
SEW00809		$44,6 \pm 5,8$
DFP00359		$88,3 \pm 8,5$
SPB02727		~ 200

4.3.3 Diskussion

Die hier präsentierte Strategie zur Suche in virtuellen Datenbanken basiert auf der Überlagerung bekannter Inhibitoren der Aldose Reduktase. In einem der Filterschritte wurde die Vereinigung dieser Inhibitoren als Referenz für die paarweise Überlagerung der Datenbankverbindungen mit dem Programm SEAL verwendet. Mit diesem Konzept konnten vier potentielle Inhibitoren identifiziert werden, die in einem Enzymassay auf ihre biologische Aktivität überprüft wurden. Bei allen ausgewählten Verbindungen handelt es sich um Carbonsäuren. Kein Carbonsäureamid oder Hydantoin konnte in der Maybridge Datenbank gefunden werden, das in der Lage war, die UNITY Pharmakophor-Hypothese zu erfüllen. Bei dem Enzymassay wurde für drei der vier getesteten Verbindungen ein IC_{50} -Wert im zweistelligen mikromolaren Bereich bestimmt.

Als aktivste Verbindung stellte sich (4-Oxo-2-phenyl-3,4-dihydro-2H-benzo[b][1,4]thiazepin-5-yl)-essigsäure (RJC00316) mit einem IC_{50} -Wert von $18 \pm 2 \mu M$ heraus. Diese Verbindung weist an dem Kohlenstoff C2 ein stereogenes Zentrum auf. Bei der getesteten Substanzprobe handelte es sich um das Racemat. Es ist fraglich, ob eines der beiden Enantiomere bevorzugt an Aldose Reduktase bindet. Falls eine Selektion durch das Enzym stattfindet, könnte die Kokristallisation der humanen Aldose Reduktase mit dem Racemat eine Antwort auf diese Frage geben. Erste Kristallisationsversuche laufen zur Zeit. Des Weiteren wird versucht, die beiden Enantiomere durch Umsetzung mit einem chiralen Auxiliar und fraktionierende Kristallisation zu trennen.

Ein Schwachpunkt des vorgestellten Konzepts zur virtuellen Datenbanksuche liegt sicherlich in der aufwendigen visuellen Inspektion und der schwierigen Beurteilung der von SEAL vorgeschlagenen Konformationen. Während der Suche wird die Form des Rezeptors nur über die Definition von verbotenen Bereichen ansatzweise berücksichtigt, Informationen über gerichtete Wechselwirkungen zwischen Ligand und Rezeptor fehlen. Dennoch konnte mit RJC00316 ein Inhibitor identifiziert werden, dessen Affinität nur unwesentlich geringer ist als die der besten Verbindungen aus der in Kapitel 4.2 präsentierten Datenbanksuche. Hinzu kommt, dass der Inhibitor RJC00316, dessen Struktur formale Ähnlichkeit zu anderen psychopharmakologisch wirksamen Benzothiazepinen aufweist, bei der in Kapitel 4.2 beschriebenen Datenbanksuche nicht gefunden werden konnte, da die dort verwendete Pharmakophor-Hypothese auf die Besetzung der IDD594-Spezifitätstasche ausgerichtet war. Interessant ist auch, dass mit dem hier beschriebenen Ansatz aktive Verbindungen gefunden werden konnten, bei denen die Säurefunktion direkt an einem Carbozyklus sitzt oder nur

durch eine Methylengruppe von diesem getrennt ist. Bei der Suche nach Inhibitoren für die IDD594-Bindetasche waren solche Verbindungen als inaktiv aufgefallen. Eine verminderte konformative Flexibilität in diesem Bereich der Moleküle scheint bei den hier getesteten Verbindungen keine negativen Auswirkungen auf die Affinität zu haben. Dies liegt vermutlich an dem Fehlen von Gruppen, die tief in eine der Spezifitätstaschen binden. Mit der hier präsentierten Strategie war aufgrund der aufwendigen visuellen Inspektion nur die Suche in der recht kleinen Maybridge Datenbank praktisch durchführbar. Darin mag das Fehlen von noch affineren Verbindungen, ebenso wie die ausschließliche Identifikation von Carbonsäuren als potentielle Inhibitoren, begründet sein.

Das von dem Programm SEAL berechnete Ähnlichkeitsmaß der überlagerten Datenbankverbindungen zu der Referenzstruktur (den vereinten bekannten Inhibitoren) bietet eine nur indirekte Grundlage für die Bewertung der Datenbankverbindungen. Somit fehlt in dem beschriebenen Ansatz bislang ein Filterschritt, der eine direkte Abschätzung der Bindungsaffinität (*scoring*) der Datenbankverbindungen erlaubt.

Quantitative Modelle von Struktur-Wirkungsbeziehungen (QSAR) bekannter Inhibitoren bieten prinzipiell die Möglichkeit zur Vorhersage der Affinität neuer Verbindungen. Grundlage für ein 3D-QSAR-Modell ist die Überlagerung der Inhibitoren. Mit dem hier beschriebenen Ansatz wurde ein Trainingsdatensatz von 39 AR-Inhibitoren überlagert. Anschließend wurde mit dem CoMSIA-Ansatz ein QSAR-Modell erstellt (Krämer et al. 2001). Dieses Modell sollte in der Folge zur Beurteilung der Kandidatenmoleküle aus der beschriebenen Datenbanksuche verwendet werden. Dabei zeigte sich allerdings, dass das QSAR-Modell nicht in der Lage ist, die experimentell bestimmten Affinitäten der getesteten Datenbankverbindungen vorherzusagen. Bei Verbindungen, die denen des Trainingsdatensatzes sehr unähnlich sind, versagt das Modell.

Ein weiterer Rezeptor basierender Filterschritt wäre wünschenswert, da (1) die Auswahl durch visuelle Inspektion sehr aufwendig ist und (2) bei anderen Arbeiten gute Erfahrungen mit der Kombination von Ligand basierenden und Rezeptor basierenden Filterschritten gemacht wurden (Grüneberg et al.). Im Bereich des Struktur basierenden Wirkstoffdesigns sind in letzter Zeit vermehrt Methoden entwickelt worden, die multiple Proteinstrukturen verwenden, um die Flexibilität des Rezeptors zu beschreiben. Dieses Konzept nutzt auch das Programm FLEXE (Claussen, Buning et al. 2001). Es vereint Proteinkonformationen, die entweder aus experimentellen Daten (Kristallstrukturen, NMR) entnommen oder mit dem Computer generiert werden, zu einer Rezeptorbeschreibung. Dabei werden die im Ensemble vertretenen Alternativen zu neuen Proteinkonformationen kombiniert.

Um FlexE zu testen, wurde erneut der zuvor beschriebene Testdatensatz verwendet. Das Ensemble bestand aus den Komplexstrukturen der Aldose Reduktase mit den Inhibitoren Sorbinil (1ah0), Tolrestat (1ah3) und IDD594. Die Verbindungen des Testdatensatzes wurden sowohl in die vereinte Rezeptorbeschreibung, als auch in die einzelnen Proteinstrukturen des Ensembles eingepasst (*crossdocking*). Zur Bewertung wurde die modifizierte Böhm-Funktion verwendet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 8 und Tabelle 9 zusammengefasst.

Es zeigt sich, dass FLEXE in der derzeitigen Version nicht in der Lage ist, die experimentellen Kristallstrukturen mit rms-Abweichungen $< 2\text{\AA}$ zu reproduzieren. Nur für die Inhibitoren Sorbinil und Fidarestat gelingt dies auf Platz eins. Zieht man auch hintere Ränge in Betracht, was im Rahmen einer Suche in großen Datenbanken aber kaum möglich ist, dann gelingt dies immerhin in vier von sieben Fällen. Dennoch sind die Ergebnisse des hier durchgeführten *crossdockings* wesentlich schlechter, als die von H. Claussen (Claussen, Buning et al. 2001) publizierten Ergebnisse. Dort wurde allerdings anstatt der IDD594-Kristallstruktur ein Modell der Kristallstruktur mit dem Inhibitor Zopolrestat verwendet. Dies mag ein Hinweis darauf sein, dass die Auswahl der Kristallstrukturen für das Ensemble ein kritischer Punkt für den Erfolg dieses Ansatzes ist. Aufgrund dieser Schwierigkeiten scheint die Verwendung von FLEXE auf dem derzeitigen Entwicklungsstand für eine virtuelle Datenbanksuche wenig aussichtsreich. Anzumerken bleibt allerdings, dass das verwendete Ensemble auf lediglich drei Proteinstrukturen begrenzt war. Möglicherweise können bessere Ergebnisse bei Verwendung eines größeren Ensembles, angereichert mit weiteren Proteinkonformationen (z.B. aus den MD-Simulationen), erreicht werden. Auch die Verwendung einer anderen Scoring-Funktion könnte zu einer Verbesserung der Ergebnisse führen.

Tabelle 8. rms-Abweichungen (in Å) zwischen den kristallographisch bestimmten Konformationen und den mit FLEXX erhaltenen Lösungen auf Platz eins (höchste Bewertung). Die Verbindungen des Testdatensatzes wurden sowohl in die *United Receptor Description* (Ensemble), als auch in die einzelnen Proteinstrukturen des Ensembles (1ah0, 1ah3, hAR-IDD594) eingepasst.

Inhibitor	Ensemble	1ah0	1ah3	hAR-IDD594
Sorbinil	1,75	7,50*	2,06	1,68
Tolrestat	6,81	7,06	1,91	3,18
IDD594	7,27	6,61	4,67	1,08
IDD384	7,99	6,23	5,68	3,08
Fidarestat	1,94	8,48	11,16	1,93
Zenarestat	7,28	7,37	5,17	0,84
Zopolrestat	9,74	8,34	7,72	0,90

* Bei Verwendung einer manuellen Basisfragment-Platzierung anhand der Referenzstruktur wird eine rms-Abweichung von 1,05 Å erhalten.

Tabelle 9. Geringste rms-Abweichungen (in Å) zwischen den kristallographisch bestimmten Konformationen und den mit FLEXX erhaltenen Lösungen. Die Platzierung der jeweiligen Docking-Lösung ist in Klammern angegeben. Die Verbindungen des Testdatensatzes wurden sowohl in die *United Receptor Description* (Ensemble), als auch in die einzelnen Proteinstrukturen des Ensembles (1ah0, 1ah3, hAR-IDD594) eingepasst.

Inhibitor	Ensemble	1ah0	1ah3	hAR-IDD594
Sorbinil	1,18 (6)	6,35 (23)*	1,22 (2)	1,51 (2)
Tolrestat	4,43 (9)	4,31 (17)	0,48 (2)	2,83 (14)
IDD594	4,54 (180)	4,56 (224)	2,79 (156)	1,08 (1)
IDD384	1,82 (171)	4,04 (419)	3,23 (172)	2,02 (140)
Fidarestat	1,94 (1)	5,97 (301)	5,07 (15)	1,82 (8)
Zenarestat	2,11 (232)	5,48 (426)	3,65 (248)	0,78 (14)
Zopolrestat	6,68 (63)	6,79 (130)	6,40 (113)	0,90 (1)

- Bei Verwendung einer manuellen Basisfragment-Platzierung anhand der Referenzstruktur wird auf Platz eins eine rms-Abweichung von 1.05 Å erhalten.

4.4 Optimierung des Inhibitors RJC03373

Bei der im vorherigen Kapitel beschriebenen Datenbanksuche hat sich die Verifizierung der mit dem Programm SEAL (Klebe, Mietzner et al. 1994) vorhergesagten Konformation als wichtiger Filterschritt herausgestellt. Dabei wurde überprüft, ob die vorhergesagte Konformation im Einklang mit der Pharmakophorhypothese steht. Nur Verbindungen, die dieses Kriterium erfüllten, wurden dann einer visuellen Inspektion unterzogen. Dabei fiel auf, dass der aus einer vorangegangenen Diplomarbeit (Krämer 1999) bekannte schwache Inhibitor RJC03373 ($IC_{50} = 0,1 \text{ mM}$) dieses Filterkriterium nicht erfüllen konnte.

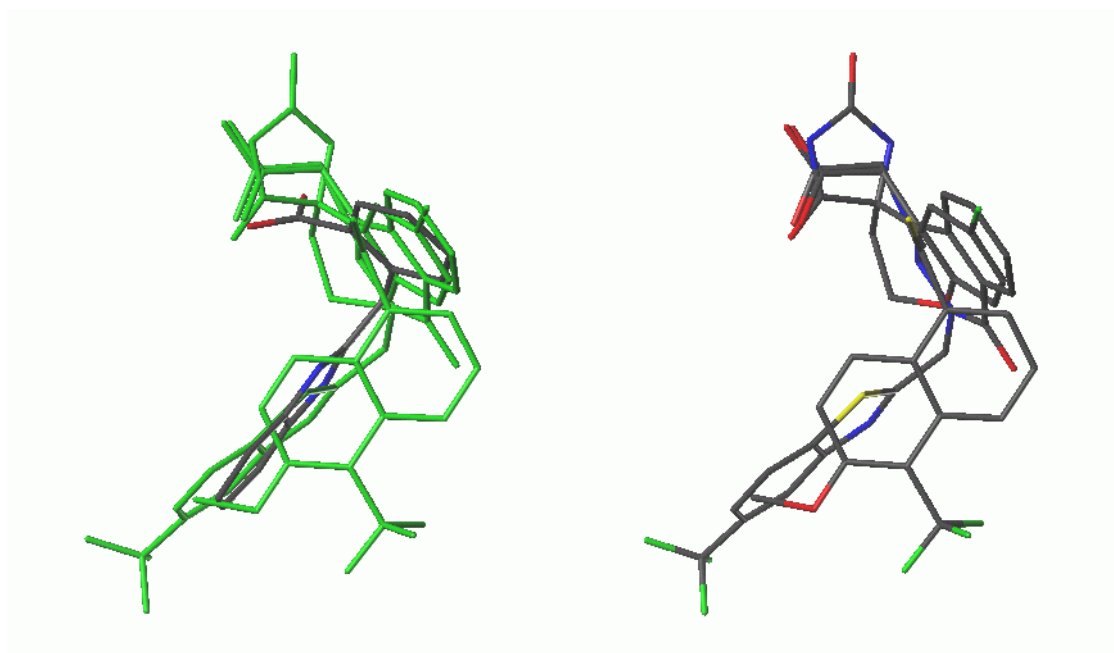
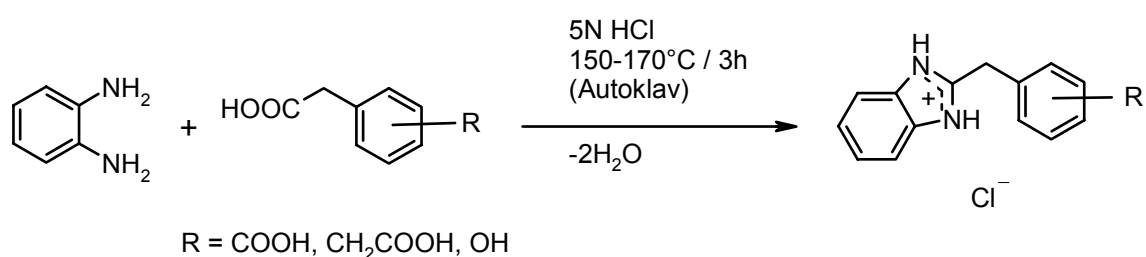


Abbildung 15. SEAL-Überlagerung des Inhibitors RJC03373 (links) auf die zu einer Referenz vereinigten Inhibitoren Sorbinil, Tolrestat und Zopolrestat (rechts). Gezeigt ist die am besten (höchstes Ähnlichkeitsmaß) bewertete Konformation.

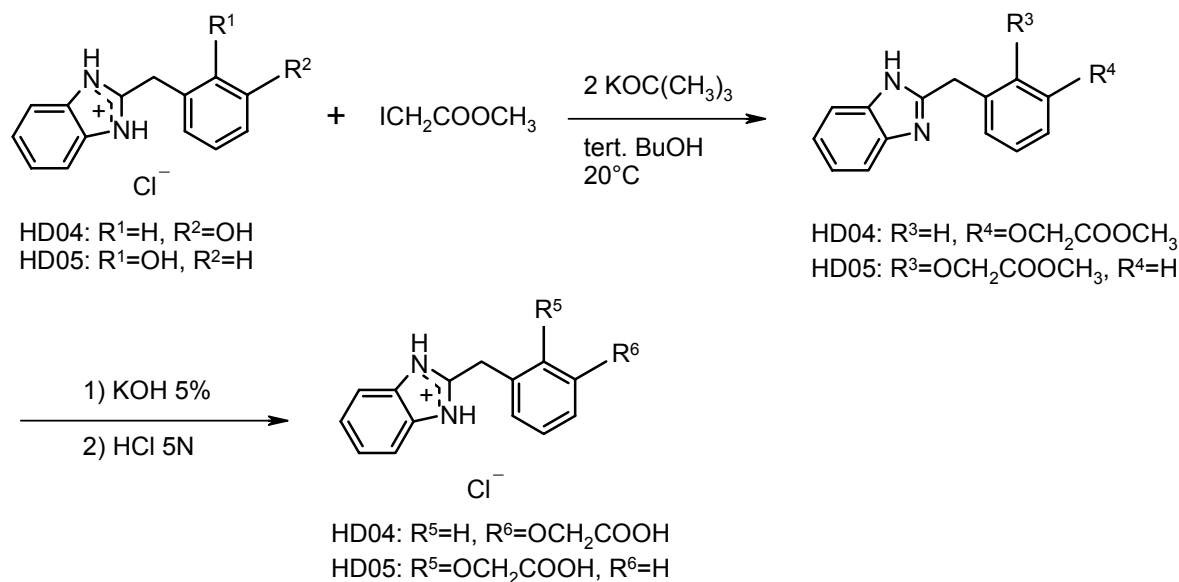
Bei der Betrachtung der am besten bewerteten (höchstes Ähnlichkeitsmaß) Konformation erkennt man, dass die Carboxylat-Gruppe des Inhibitors nicht optimal auf die Referenz platziert wird. Da die Orientierung dieser Gruppe in der Anionen-Bindetasche kritisch ist (siehe Kapitel 4.2.3), wurde vermutet, dass eine Veränderung der relativen Stellung der Carboxylat-Gruppe zum Benzimidazol-2-ylmethyl-Substituenten und die Einführung eines *spacers* zwischen Benzolring und Carboxylat-Gruppe eine Verbesserung der Affinität bewirken könnten.

Zur Synthese³ der entsprechenden Derivate wurde die Phillips-Reaktion (Phillips 1928; Preston 1974) angewendet (s. Schema 1). Die eingesetzten Carboxymethyl-benzoesäuren, -phenole und -phenyllessigsäuren waren bis auf 3-Carboxymethyl-benzoesäure kommerziell erhältlich. 3-Carboxymethyl-benzoesäure war in einer 4-stufigen Synthesefolge (Richter et al. 1974) ausgehend von 3-Cyano-benzaldehyd zugänglich.

Durch eine Phenolether-Kupplung und anschließende alkalische Ester-Spaltung konnten die Derivate HD04 und HD05 ausgehend von den mittels der Phillips-Reaktion erhaltenen (1H-Benzimidazol-2-ylmethyl)-phenolen synthetisiert werden (s. Schema 2).



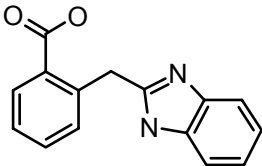
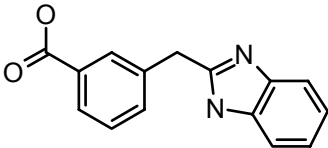
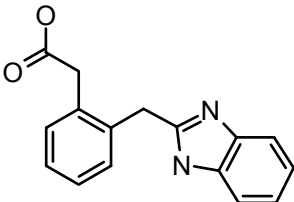
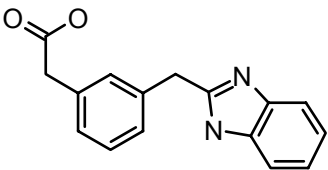
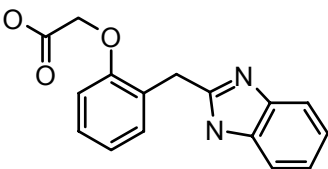
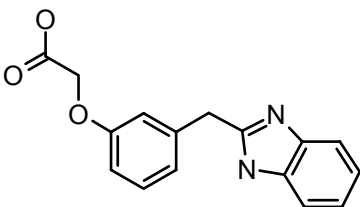
Schema 1. Phillips-Reaktion.



Schema 2. Phenolether-Kupplung und anschließende alkalische Ester-Spaltung.

³ Die Synthese der nachfolgend beschriebenen Derivate wurde von H.D. Gerber (Universität Marburg) durchgeführt.

Tabelle 10. Inhibitor RJC03373 und Derivate mit IC₅₀ Werten.

Code	Name (IUPAC)	Strukturformel	IC ₅₀ [μM]
RJC03373	2-(1H-Benzimidazol-2-ylmethyl)-benzoesäure		100 ± 16
HD01	3-(1H-Benzimidazol-2-ylmethyl)-benzoesäure		3200 ± 400
HD02	[2-(1H-Benzimidazol-2-ylmethyl)-phenyl]-essigsäure		1100 ± 200
HD03	[3-(1H-Benzimidazol-2-ylmethyl)-phenyl]-essigsäure		42,3 ± 10,8
HD05	[2-(1H-Benzimidazol-2-ylmethyl)-phenoxy]-essigsäure		43,0 ± 9,0
HD04	[3-(1H-Benzimidazol-2-ylmethyl)-phenoxy]-essigsäure		3,4 ± 0,6

In Tabelle 10 sind die Strukturformeln der synthetisierten Derivate und die experimentell ermittelten IC_{50} Werte (siehe Kapitel 6.1) angegeben. Während der Wechsel von der ortho- in die meta-Position zunächst zu einem drastischen Aktivitätsverlust führte (**HD01**), zeigte die Einführung einer Methylen- bzw. einer Oxymethylen-Gruppe als *spacer* den gewünschten Effekt. Bei den Derivaten mit einer solchen Gruppe stellte sich tatsächlich jeweils die meta-substituierte Verbindung (**HD03**, **HD04**) als die aktivere im Vergleich zur entsprechenden ortho-substituierten Verbindung (**HD02**, **HD05**) heraus. Die Verbindung mit der höchsten Affinität ist [3-(1H-Benzimidazol-2-ylmethyl)-phenoxy]-essigsäure. Mit einem IC_{50} Wert von $3,4 \pm 0,6 \mu\text{M}$ ist sie etwa um einen Faktor 30 affiner als die Ausgangsverbindung RJC03373.

Eine Erklärung der beobachteten Trends anhand der Modeling-Ergebnisse ist nicht möglich. Überlagert man die Derivate mit SEAL auf die Referenz, dann wird in allen Fällen eine Konformation vorgeschlagen, die die Pharmakophor-Hypothese erfüllt. Auch die vergebenen Ähnlichkeitsmaße erlauben keine Differenzierung.

Ein besseres Verständnis wurde erst durch die Bestimmung der Kristallstruktur des Derivates HD04 im Komplex mit humaner Aldose Reduktase ermöglicht (s. nächstes Kapitel).

4.5 Kristallstruktur der hAR im Komplex mit dem Inhibitor HD04

Humane Aldose Reduktase wurde aus *E.coli* exprimiert und bei 4 °C (nach dem *seeding* bei 24 °C) aus Ammoniumcitrat-Puffer (120 mM, 20% PEG 6000, pH 5,0) zusammen mit NADP⁺ und dem Inhibitor HD04 kokristallisiert. Der Datensatz wurde bei –196 °C an der Synchrotron Lichtquelle Schweiz (SLS) des Paul Scherrer Instituts (Villigen, Schweiz) gesammelt. Reflexe konnten bis zu Beugungswinkeln, die einer Auflösung von 1,30 Å entsprechen, beobachtet werden. Die Daten wurden mit HKL2000 (Otwinowski et al. 1997) prozessiert und skaliert⁴. Die Struktur von hAR im Komplex mit dem Inhibitor IDD384 (PDB-Code 1el3) wurde als Startstruktur für die Verfeinerung verwendet. Bei der ersten Verfeinerung mit dem CNS-Paket (Brünger et al. 1998) wurden eine *rigid-body* und eine *simulated-annealing* Minimierung durchgeführt. Sowohl der Inhibitor als auch ein Citrat-Molekül waren eindeutig in der $F_o - F_c$ -Elektronendichte zu sehen und konnten problemlos eingepasst werden (vgl. Abbildung 16).

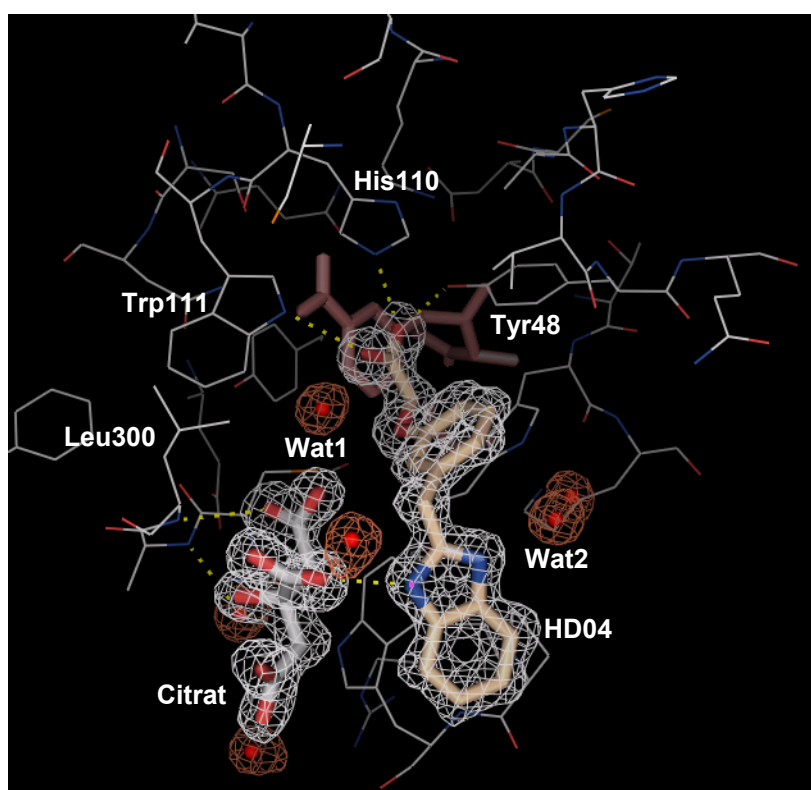


Abbildung 16. Blick in die Bindetasche der hAR im Komplex mit dem Inhibitor HD04. Der Inhibitor ist zusammen mit der $2F_o - F_c$ Elektronendichte dargestellt. Ebenfalls innerhalb dieser Elektronendichte dargestellt sind das benachbarte Citrat-Molekül und mehrere Wassermoleküle.

Die Verfeinerung der Daten wurde anschließend mit SHELXL-97 (Sheldrick et al. 1997) fortgesetzt⁵. Hierbei wurden mindestens 10 Zyklen von *conjugate gradient* Minimierung pro Verfeinerung durchgeführt mit Einschränkungen (*restraints*) für die Bindungslängen, -winkel und B-Werte. Für den Kofaktor und Liganden wurden die Einschränkungen (*restraints*) zunächst aus den PDB-Koordinaten erzeugt um anschließend weitere notwendige Bedingungen zur Erzwingung planarer Geometrien hinzuzufügen. Bei der gegebenen Auflösung war es möglich, die Atome mit anisotropen B-Werten zu verfeinern, was durch die Abnahme von R_{free} gerechtfertigt erschien. Während der letzten Verfeinerungen wurden Wasserstoffatome in idealen Positionen nach einem Reitermodell (*riding model*) verfeinert, ohne dass dafür zusätzliche Parameter verwendet wurden. Tabelle 11 fasst die statistischen Ergebnisse der Datensammlung und Verfeinerung zusammen.

Tabelle 11. Statistische Ergebnisse der Datensammlung und Verfeinerung des Komplexes hAR-HD04. # Werte in Klammern beziehen sich auf den höchsten Auflösungsbereich. * $R_{\text{sym}} = [\sum_h \sum_i |I_i(h) - \langle I(h) \rangle| / \sum_h \sum_i I_i(h)] \times 100$, wobei I die gemessene Intensität und $\langle I \rangle$ die durchschnittliche Intensität für multiple Messungen ist. ** $R_{\text{cryst}} = \sum_{hkl} |F_o - F_d| / \sum_{hkl} |F_d|$ *** Der R_{free} -Faktor wurde analog zu R_{sym} aus einer zufälligen Auswahl von Reflexen aus 10% der Daten berechnet. **** Berechnet mit PROCHECK (Laskowski et al. 1993).

Auflösung (Å)	25-1,30
Raumgruppe	P2 ₁
Zellkonstanten (Å, ° for β)	a = 49,2; b = 66,6; c = 47,1; β = 92,4
Höchster Auflösungsbereich (Å)	1,35 – 1,30
Zahl der gemessenen Reflexe	181872
Zahl der unabhängigen Reflexe	69006
Vollständigkeit der Daten (%)	93,3 [63,7] [#]
Mittleres I/σ_i	21,7 [3,4]
R_{sym} (%) [*]	4,5 [21,3]
Zahl verfeinerter Proteinatome (Aminosäuren)	2545 (316)
Zahl verfeinerter Kofaktor-Atome	48

⁴ Diese Arbeiten wurden von I. Hazeman, A. Mitschler und B. Chevrier am IGBMC in Straßburg durchgeführt.

⁵ Diese Verfeinerungszyklen wurden von Dr. A. Heine durchgeführt.

Zahl verfeinerter Inhibitor-Atome	21
Zahl verfeinerter Citrat-Atome	13
Zahl verfeinerter Wassermoleküle	490
Auflösungsbereich der Verfeinerung (Å)	10-1,35
$R_{\text{cryst}} (F_0 > 4\sigma F_0; F_0)^{**}$	11,6; 12,2
$R_{\text{free}} (F_0 > 4\sigma F_0; F_0)^{***}$	16,8; 17,4
<i>rms Abweichungen</i>	
Bindungslängen (Å)	0,012
Bindungswinkel (°)	2,4
Durchschnittliche B-Faktor (Å ²)	15,1
Hauptkette (Å ²)	12,8
Seitenketten (Å ²)	17,5
Kofaktor (Å ²)	8,5
Inhibitor (Å ²)	13,3
Citrat (Å ²)	18,4
Wassermoleküle (Å ²)	33,0
<i>Ramachandran Plot****</i>	
Sehr günstig (%)	91,3
Erlaubt (%)	8,7
Noch erlaubt (%)	0,0
Verboten (%)	0,0

Der Komplex kristallisiert in einer monoklinen Kristallform mit ähnlichen Zellkonstanten wie der Komplex mit dem Inhibitor IDD384 (PDB-Code 1el3). Auch die räumliche Anordnung der Aminosäuren ist in beiden Komplexen sehr ähnlich (rms-Abweichung der C^α-Positionen: 0,35 Å). Die atomare Anordnung im HD04-Komplex unterscheidet sich zudem nur unwesentlich von der Anordnung, die im humanen Holo-Enzym (PDB-Code 1ads) beobachtet wurde (rms-Abweichung der C^α-Positionen: 0,56 Å). Der Inhibitor bindet an das nahezu unveränderte Holo-Enzym und besetzt nicht, wie ursprünglich vermutet, eine IDD594- oder Zopolrestat-ähnliche Spezifitätstasche. Während die Position des Phenoxyessigsäure-Restes im aktivem Zentrum exakt der bei IDD594 beobachteten Anordnung entspricht, nimmt der Benzimidazol-Rest eine Position ein, die insofern dem Bindungsmodus des IDD384 ähnelt, als dass er außerhalb des aktiven Zentrums in einem Lösungsmittel-zugänglichen Bereich platziert wird (s. Abbildung 17).

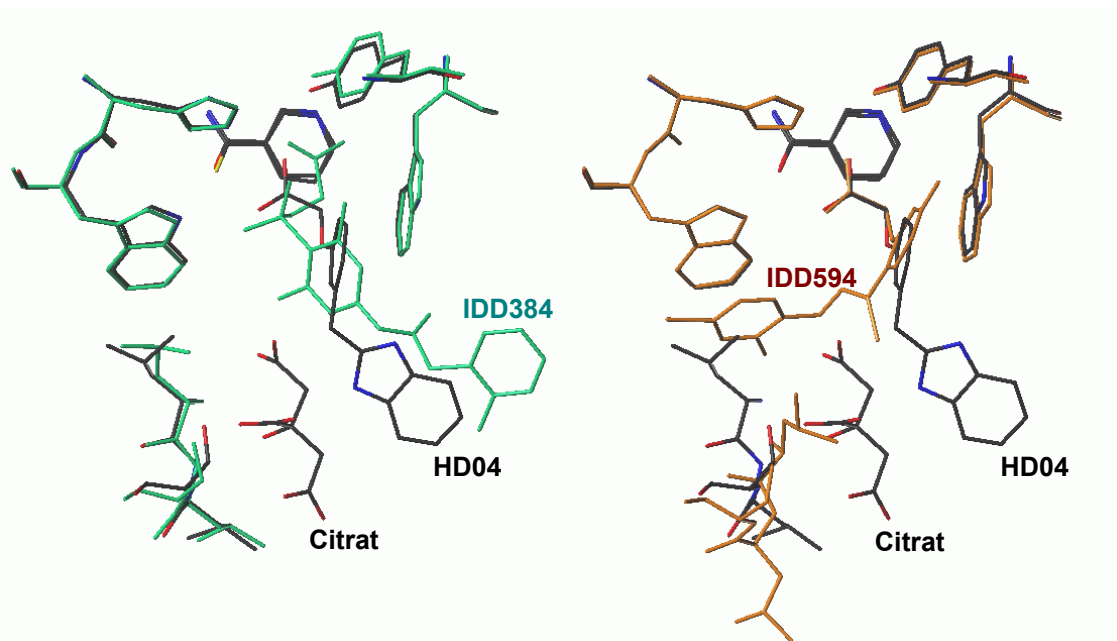


Abbildung 17. Ausschnitt aus den Komplexstrukturen von hAR mit den Inhibitoren HD04 (eingefärbt nach Atomtyp), IDD384 (links, in grün) und IDD594 (rechts, in orange).

Die Carboxylat-Gruppe des Inhibitors bildet ein Netzwerk von Wasserstoffbrückenbindungen zu den Aminosäuren des katalytischen Zentrums (der Anionen-Bindetasche) der Aldose Reduktase aus. Eines der beiden Sauerstoffatome geht Wasserstoffbrückenbindungen mit Tyr48 O η (2,8 Å) und mit His110 N ϵ 2 (2,7 Å) ein, während sich das zweite Sauerstoffatom in Wasserstoffbrückenbindungsdistanz zu Trp111 N ϵ 1 (3,0 Å) befindet.

Erstmals in dieser Struktur nachgewiesen ist die Beteiligung eines Citrat-Moleküls an der Bindung des Inhibitors (s. Abbildung 18). Das Citrat-Molekül verbrückt die Wechselwirkung des Inhibitors mit der Schleifenregion um Leu300. Zwei der drei Carboxylat-Gruppen und die Hydroxyl-Gruppe des Citrats gehen gerichtete Wechselwirkungen mit dem Rückgrat dieser Schleife ein. Kurze Kontakte bestehen zwischen dem Sauerstoff der Hydroxylgruppe und dem Stickstoff von Leu301 (2,8 Å), zwischen einem Sauerstoff der ersten Carboxylat-Gruppe und dem Stickstoff von Leu300 (3,0 Å), sowie zwischen einem Sauerstoff der zweiten Carboxylat-Gruppe und dem Stickstoff von Ser302 (3,0 Å). Der andere Sauerstoff der zweiten Carboxylat-Gruppe bildet eine Wasserstoffbrücke zu einem Stickstoff des Benzimidazol-Ringsystems (2,7 Å) aus und verbrückt so den Inhibitor mit dem Protein.

Ebenfalls an der Bindung des Inhibitors beteiligt ist ein Wassermolekül (Wat1), das in der Nähe des aktiven Zentrums zwischen Inhibitor und Citrat platziert ist. Dieses Wassermolekül geht eine Wasserstoffbrückenbindung zu dem zweiten Sauerstoff der ersten Carboxylat-Gruppe des Citrats ein (2,6 Å). Da es auch in kurzer Distanz zu einem Carboxylat-Sauerstoff

des Inhibitors steht (2,8 Å), verbrückt es die Wechselwirkung zwischen dem Inhibitor und dem Citrat.

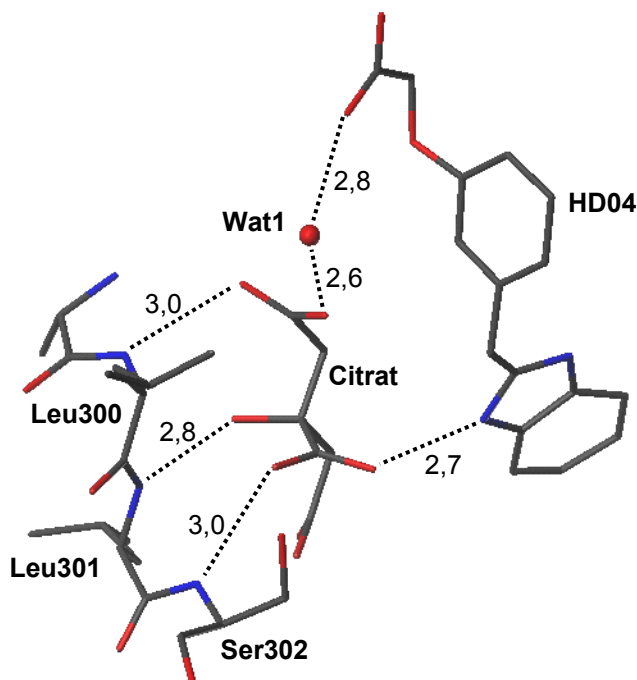


Abbildung 18. Der Inhibitor ist über ein Citrat-Molekül mit der Schleifenregion um Leu300 verbrückt. Ein Wassermolekül, das als Wasserstoffbrücken-Donor oder –Akzeptor fungieren kann, sitzt in der Bindetasche und vermittelt die Wechselwirkung zwischen der Carboxylat-Gruppe des Inhibitors und dem Citrat-Molekül. Distanzen zwischen den Atomen sind in Å angegeben.

Die Beteiligung des Citrat-Moleküls an der Bindung des Inhibitors HD04 verweist auf die Möglichkeit, die beiden Moleküle zu einem neuen potenteren Inhibitor zu verknüpfen. Theoretisch ergibt sich dabei die Bindungsenergie der verknüpften Verbindung aus der Summe der Bindungsenergien der beiden Fragmente (zuzüglich eines Beitrags durch die Verknüpfung) (Jencks 1981). So kann die Affinität des neuen Inhibitors auf ein Vielfaches der Affinitäten der ursprünglichen Fragmente gesteigert werden. Dieser Ansatz wurde von Fesik et al. (Hajduk et al. 1997) unter der Bezeichnung „SAR by NMR“ bekannt gemacht: Die Methode identifiziert mittels NMR-Spektroskopie kleine Fragmente aus Substanzbibliotheken, die an den vorgegebenen Rezeptor binden. Anschließend werden diese unter Erhalt ihrer experimentell beobachteten, gebundenen Konformation verknüpft. Mit diesem Ansatz konnte ein Molekül, das sehr fest ($K_d=19$ nM) an das FK506-Bindeprotein (FKBP) bindet, aus zwei nur schwach bindenden ($K_d=2\mu\text{M}$ und $100\mu\text{M}$) Fragmenten abgeleitet werden (Shuker et al. 1996).

Das gleiche Konzept wird auch von Computerprogrammen zum *de novo*-Design von Inhibitoren verwendet (Schneider and Böhm 2002). Die Fragmente werden anhand potentieller Interaktionspunkte in der Tasche der Rezeptors platziert und anschließend zu neuen Molekülen kombiniert (s. Abbildung 19). Bei diesem sogenannten „kombinatorischen Docking“ werden nur solche Molekül-Bausteine (Synthone) als Fragmente verwendet, von denen bekannt ist, dass sie die gewünschte chemische Verknüpfungsreaktion mit hoher Wahrscheinlichkeit eingehen werden.

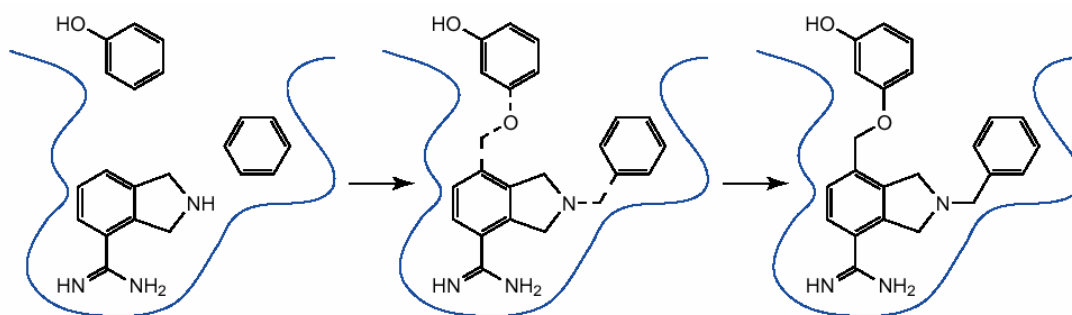
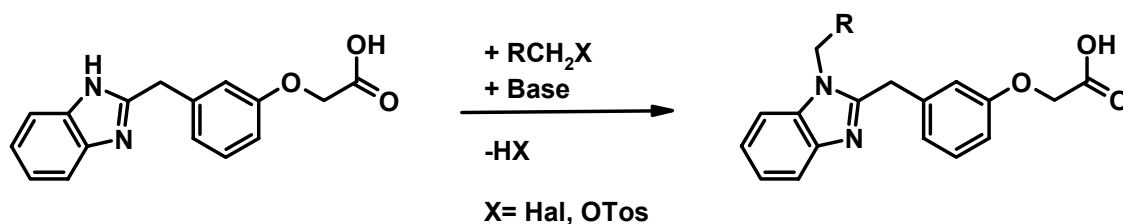


Abbildung 19. Strategie zum Struktur basierenden Molekülaufbau aus Fragmenten. Die Fragmente werden in der Bindetasche platziert und anschließend verknüpft. Entnommen aus (Schneider and Böhm 2002).

Da hier der Inhibitor HD04 als ein Fragment vorgegeben ist, muss zunächst überlegt werden, auf welchem Syntheseweg die Verknüpfung mit anderen Fragmenten möglich ist. Dann können Fragmente gesucht werden, die (1) die für die Verknüpfungsreaktion notwendigen funktionellen Gruppen aufweisen und (2) aufgrund ihrer sonstigen funktionellen Gruppen und konformativen Eigenschaften mit hoher Wahrscheinlichkeit in der Lage sind, die gleichen Wechselwirkungen mit dem Protein einzugehen, die die Analyse der HD04-Kristallstruktur für das Citrat-Molekül ergeben hat. Eine Möglichkeit zur Verknüpfung mit Fragmenten, die eine gute Abgangsgruppe (z.B. Halogene oder Tosylat-Gruppen) besitzen, könnte die nucleophile Substitution der Abgangsgruppe nach Deprotonierung der Benzimidazol-Gruppe des HD04 mit einer Base sein (s. Schema 3).



Schema 3. Ansatz zur Verknüpfung von HD04 mit Fragmenten, die eine gute Abgangsgruppe besitzen.

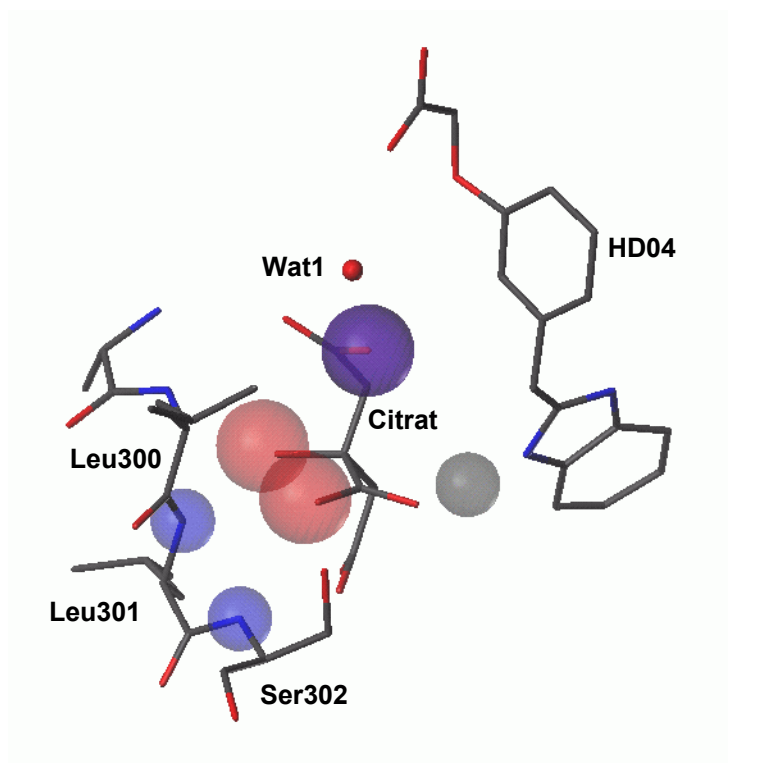


Abbildung 20. Unity-Suchanfrage für die Suche nach Fragmenten zur Verknüpfung mit dem Inhibitor HD04. Der Inhibitor HD04, Citrat und einige Aminosäuren des Proteins sind zur Verdeutlichung dargestellt. Akzeptorgruppen sind rot eingefärbt, die dazugehörigen Donorgruppen auf Proteinseite sind blau eingefärbt. Die ambivalente Donor-Akzeptor-Gruppe ist violett markiert. Innerhalb der grau dargestellten Sphäre wird die Platzierung des Kohlenstoffatoms, das die Abgangsgruppe tragen soll, verlangt.

Abbildung 20 zeigt eine mögliche Suchfrage mit dem Programm UNITY, bei der die wichtigsten Wechselwirkungen des Citrat-Moleküls mit den Aminosäuren Leu300-Ser302 bzw. mit dem Wassermolekül, das die Wechselwirkung zur Carboxylat-Gruppe des HD04 vermittelt, berücksichtigt wurden.

Die Suche nach geeigneten Fragmenten in virtuellen Datenbanken wird zur Zeit durchgeführt. Die Zukunft wird zeigen, ob es tatsächlich gelingt, diese mit dem Inhibitor HD04 zu verknüpfen und ob dies zu einer Steigerung der Affinität führt.

4.6 Thermodynamische Messungen

Um die Bindung innerhalb einer Reihe von AR-Inhibitoren thermodynamisch zu charakterisieren, wurden ITC-Messungen mit humaner Aldose Reduktase und NADP^+ als Kofaktor durchgeführt. Kinetische Untersuchungen der Reduktion von DL-Glyceraldehyd durch Aldose Reduktase aus Schweinemuskeln bei pH 7,0 haben zu der Schlussfolgerung geführt, dass der Reaktion ein geordneter Mechanismus zugrundeliegt. Demnach bindet zunächst der Kofaktor NADP(H) an das Apo-Enzym, was zu einer Konformationsänderung des Proteins führt. Erst dann bindet das Substrat (Kubiseski et al. 1992). Da hier die Bindung der Inhibitoren an das Holo-Enzym studiert werden soll, wurde der Kofaktor im 10fachen Überschuss (bezogen auf hAR), bei gleicher Konzentration in der Messzelle und in der Spritze, eingesetzt. Die gleiche Konzentration in Messzelle wie Spritze ist erforderlich, um Wärmetönungen aufgrund von Mischungseffekten zu minimieren. Alle Messungen wurden bei 25°C und pH 8,0 durchgeführt. Die Konzentration des jeweiligen Puffers lag in allen Fällen bei 10 mM. Untersucht wurde auch die Abhängigkeit der thermodynamischen Daten vom verwendeten Puffersystem und dem Oxidationszustand des Kofaktors.

4.6.1 Bestimmung der Bindungskonstanten

Für die Inhibitoren Sorbinil, HD04, IDD370, Tolrestat, IDD594 und IDD393 (Formeln s. Seite 3) konnten die Bindungskonstanten K für die Wechselwirkung mit humaner Aldose Reduktase thermodynamisch bestimmt werden. In Tabelle 12 sind die Werte für die beiden verwendeten Puffersysteme TRIS und HEPES (jeweils 10 mM) aufgelistet. Die Messungen wurden bei pH 8,0 durchgeführt. Es wird ein Bereich von $0,4 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$ bis $1,7 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}$ für die Bindungskonstanten abgedeckt.

In Tabelle 13 sind die pK_D -Werte aufgeführt, die den negativen dekadischen Logarithmus der Dissoziationskonstanten K_D darstellen. Diese verhält sich reziprok zur gemessenen Bindungskonstanten K . Verwendet wurde die gemittelte Bindungskonstante aus den Messungen mit TRIS- und HEPES-Puffer. Dem sind die kinetisch bestimmten Inhibitionskonstanten IC_{50} bzw. K_i -Werte gegenübergestellt. Tabelle 13 und Abbildung 21 zeigen, dass die thermodynamisch gemessenen Werte gut mit den kinetisch bestimmten Größen übereinstimmen.

Tabelle 12. Bindungskonstanten K für verschiedene Inhibitoren gegenüber humaner Aldose Reduktase. Die Werte wurden für zwei verschiedene Puffersysteme ermittelt. *: Nicht bestimmt.

Substanz	Bindungskonstanten K (10^6 M^{-1})	
	TRIS	HEPES
Sorbinil	21,5±3,2	14,1±2,6
HD04	0,5±0,1	0,4±0,0
Tolrestat	10,8±4,2	30,3±8,5
IDD594	77,0±32,7	70,6±14,3
IDD393	173±53	*
IDD370	4,3±1,4	*

Tabelle 13. Vergleich der kinetisch gemessenen Inhibitionskonstanten IC_{50} bzw. K_i (pK_i) und der thermodynamisch gemessenen Dissoziationskonstanten K_D (pK_D) (Kapitel 6.8).

Substanz	kinetisch			thermodynamisch	
	IC_{50} (nM)	K_i (nM)	pK_i	K_D (nM)	pK_D
Sorbinil	585	127	6,9	56,2	7,3
HD04	3400	3400	5,5	2390	5,6
Tolrestat	35	35	7,5	48,7	7,3
IDD594	30	30	7,5	13,6	7,9
IDD393	6	6	8,2	5,8	8,2
IDD370	590	590	6,2	230	6,6

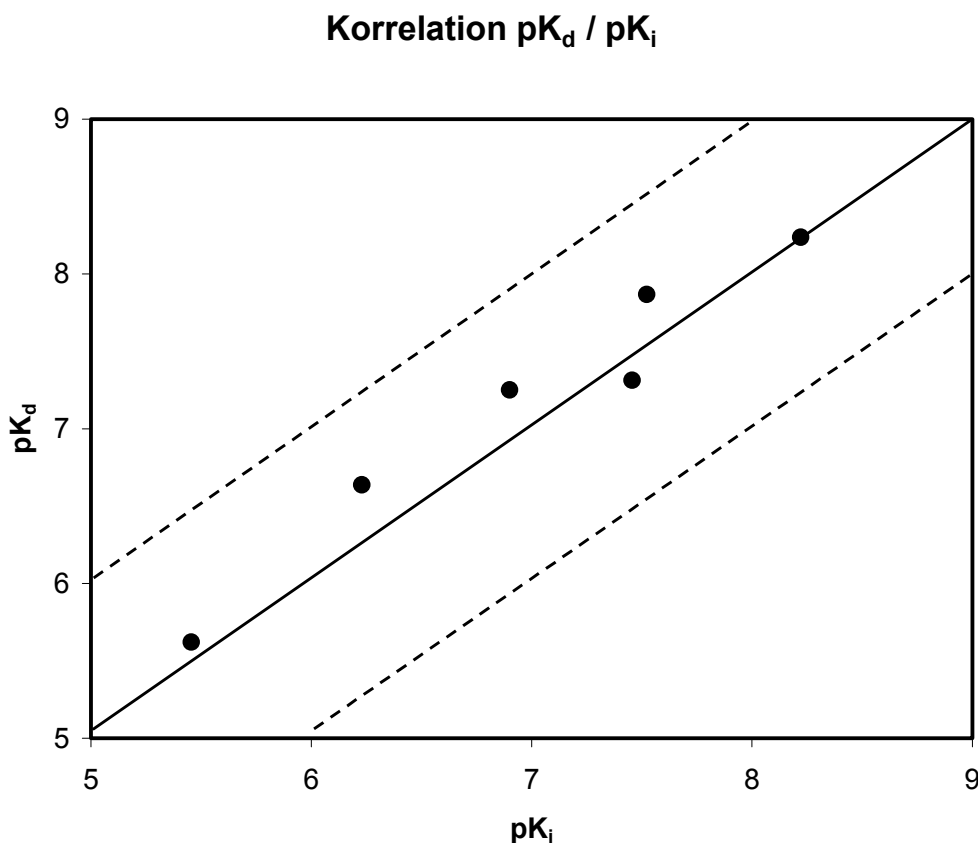


Abbildung 21. Korrelation zwischen thermodynamisch gemessenen Dissoziationskonstanten pK_D und kinetisch bestimmten pK_i -Werten. Die gestrichelten Linien deuten die Abweichung einer Größenordnung an.

Beim Vergleich der Dissoziationskonstanten pK_D , die durch thermodynamische Messungen bestimmt wurden, mit den kinetisch gemessenen Inhibitionskonstanten pK_i fällt auf, dass sich die Werte um weniger als 0,5 logarithmische Einheiten unterscheiden. Diese gute Übereinstimmung steht im Einklang mit dem in der Literatur beschriebenen (Ehrig, Bohren et al. 1994) Vorliegen einer nicht-kompetitiven Inhibition im Falle der Carbonsäure-Inhibitoren, da dann gilt $K_i = IC_{50}$ (Copeland 1996). Für Sorbinil wurde das Vorliegen einer unkompetitiven Hemmung beschrieben (Kato et al. 1991). In diesem Fall lässt sich K_i nach Gleichung 3 (Copeland 1996) aus dem gemessenen IC_{50} -Wert berechnen. In dem zugrundeliegenden Enzymassay (s. Kapitel 6.2) wurde D-Xylose mit einer Konzentration von 26,6 mM verwendet, der entsprechende K_m -Wert von 7,4 mM wurde aus der Literatur (Bohren, Grimshaw et al. 1994) entnommen.

Gleichung 3

$$K_i = IC_{50} / (1 + [S]/K_m)$$

4.6.2 Änderung der Protonierungszustände bei der Bindung

Für die oben genannten Verbindungen wurden die kompletten thermodynamischen Parameter für die Bindung an humane Aldose Reduktase bestimmt. Die gesamte Wärmetönung ΔH_{ges} und die Bindungskonstante K wurden direkt aus der beobachteten Bindungsisothermen bestimmt (siehe Kapitel 6.3.3). Die Freie Enthalpie ΔG leitet sich aus der Bindungskonstanten K nach Gleichung 19 ab. Der entropische Anteil ergibt sich dann aus der Differenz von Freier Enthalpie ΔG und beobachteter Wärmetönung ΔH_{ges} . Zur Bestimmung sich überlagernder Prozesse wurden die thermodynamischen Parameter der Inhibitoren in TRIS-Puffer (Tabelle 14) und HEPES-Puffer (Tabelle 15) ermittelt.

Die ΔG -Werte fallen in einen relativ engen Bereich zwischen $-47,0$ und $-31,8$ kJ/mol, während bei den gemessenen enthalpischen Wärmetönungen ΔH_{ges} der Messbereich erheblich größer ist ($-72,7$ bis $-13,3$ kJ/mol). Dies wirkt sich dementsprechend auf den Betrag des entropischen Terms aus. Diese Werte liegen im Bereich von $-26,6$ bis $+9,3$ kJ/mol.

Substanz	K (10^6 M^{-1})	ΔG (kJ mol^{-1})	ΔH_{ges} (kJ mol^{-1})	$\Delta G - \Delta H_{\text{ges}}$ (kJ mol^{-1})
Sorbinil	21,5 \pm 3,2	-41,9 \pm 0,4	-47,7 \pm 0,3	5,8 \pm 0,5
HD04	0,5 \pm 0,1	-32,4 \pm 0,5	-22,6 \pm 0,8	-9,8 \pm 0,9
Tolrestat	10,8 \pm 4,2	-40,2 \pm 1,0	-13,6 \pm 0,2	-26,6 \pm 1,0
IDD594	77,0 \pm 32,7	-45,0 \pm 1,1	-38,6 \pm 0,5	-6,4 \pm 1,2
IDD393	173 \pm 53	-47,0 \pm 0,8	-56,3 \pm 0,4	9,3 \pm 0,9
IDD370	4,3 \pm 1,4	-37,9 \pm 0,8	-13,3 \pm 0,2	-24,6 \pm 0,8

Tabelle 14. Thermodynamische Parameter ΔH_{ges} , ΔG und $\Delta G - \Delta H_{\text{ges}}$ und K für verschiedene hAR Inhibitoren. Die Messungen wurden in TRIS-Puffer durchgeführt. Die Wärmetönung ΔH_{ges} und die Bindungskonstante K wurden direkt aus der gemessenen Bindungsisothermen bestimmt.

Substanz	K (10^6 M^{-1})	ΔG (kJ mol^{-1})	ΔH_{ges} (kJ mol^{-1})	$\Delta G - \Delta H_{\text{ges}}$ (kJ mol^{-1})
Sorbinil	14,1 \pm 2,6	-40,8 \pm 0,5	-37,0 \pm 0,5	-3,9 \pm 0,7
HD04	0,4 \pm 0,0	-31,8 \pm 0,0	-37,8 \pm 1,0	6,0 \pm 1,0
Tolrestat	30,3 \pm 8,5	-42,7 \pm 0,7	-27,1 \pm 0,4	-15,6 \pm 0,8
IDD594	70,6 \pm 14,3	-44,8 \pm 0,5	-50,0 \pm 0,4	5,2 \pm 0,6
IDD393	*	*	-72,7 \pm	*

Tabelle 15. Thermodynamische Parameter ΔH_{ges} , ΔG und $\Delta G - \Delta H_{\text{ges}}$ und K für verschiedene hAR Inhibitoren. Die Messungen wurden in HEPES-Puffer durchgeführt. Die Wärmetönung ΔH_{ges} und die Bindungskonstante K wurden direkt aus der gemessenen Bindungsisothermen abgeleitet. *: Nicht bestimmt.

4.6.2.1 Pufferbeiträge

Um die intrinsische Bindungsenthalpie ΔH_{bind} zu bestimmen, wurden die ITC-Experimente bei pH 8,0 und 25°C in zwei verschiedenen Puffern (TRIS und HEPES) mit unterschiedlichen Ionisierungsenthalpien ΔH_{ion} durchgeführt. Die jeweiligen Messpuffer enthielten 10mM Puffersubstanz. In Tabelle 16 sind die verwendeten Puffersubstanzen mit ihren entsprechenden Ionisierungsenthalpien ΔH_{ion} aufgeführt.

Tabelle 16. Übersicht über die verwendeten Ionisierungsenthalpien bei 25°C. Die Werte beziehen sich auf die Deprotonierung der Puffersubstanz. Werte entnommen aus (Fukada et al. 1998).

Puffersubstanz	Ionisierungsenthalpie ΔH_{ion} (kJ/mol)
HEPES	21,07
TRIS	48,07

Werden gleichzeitig mit der Bindungsreaktion Protonen vom untersuchten System aufgenommen oder abgegeben, müssen der enthalpische Beitrag des Puffers bzw. die enthalpischen Beiträge der ionisierbaren Protein- bzw. Ligandengruppen, auf die diese Protonierungsreaktionen zurückzuführen sind, von der gemessenen Gesamtenthalpie ΔH_{ges} abgezogen werden, um die intrinsische Bindungsenthalpie ΔH_{bind} zu erhalten. Nach Abzug der Ionisierungsenthalpie des Puffers erhält man die korrigierte Enthalpie ΔH_{x} . Anschließend muss noch um die Wärmetönung korrigiert werden, die für die Protonierung/Deprotonierung der entsprechenden funktionellen Gruppe des Liganden oder Proteins auftritt. Erst nach Berücksichtigung des enthalpischen Beitrags dieser ionisierbaren Gruppe ergibt sich die intrinsische Enthalpie ΔH_{bind} (siehe nächstes Kapitel).

Alle untersuchten Verbindungen zeigen eine Abhängigkeit der Enthalpie von der verwendeten Puffersubstanz (s. Tabelle 17). Die Art der Abhängigkeit ist bei allen Inhibitoren mit einer Carboxylat-Gruppe gleich, die größeren Enthalpien wurden in HEPES-Puffer gemessen. Im Gegensatz dazu wurde für Sorbinil in TRIS-Puffer die größere Enthalpie gemessen.

Tabelle 17. Gemessene Enthalpien ΔH_{ges} für verschiedene Inhibitoren in TRIS- und HEPES-Puffer bei 25°C.

Substanz	Enthalpie ΔH_{ges} (kJ/mol)	
	TRIS	HEPES
Sorbinil	-47,7±0,3	-37,0±0,5
HD04	-22,6±0,8	-37,8±1,0
Tolrestat	-13,6±0,2	-27,1±0,4
IDD594	-38,6±0,5	-50,0±0,4
IDD393	-56,3±0,4	-72,7±0,5
IDD370	-13,3±0,2	*

Nach Auftragung der gemessenen Wärmetönung ΔH_{ges} gegen die Ionisierungsenthalpie ΔH_{ion} des Puffers können die Anzahl der vom Puffer auf das Protein-Ligand-System übertragenen Protonen (Größe n) und die Enthalpie ΔH_x der Reaktion, die die um ΔH_{ion} korrigierte Reaktionsenthalpie ΔH_{ges} darstellt, bestimmt werden. Die Größe n ergibt sich nach Gleichung 23 aus der Steigung der verbindenden Geraden und ΔH_x als Achsenabschnitt auf der Ordinate ΔH_{ges} .

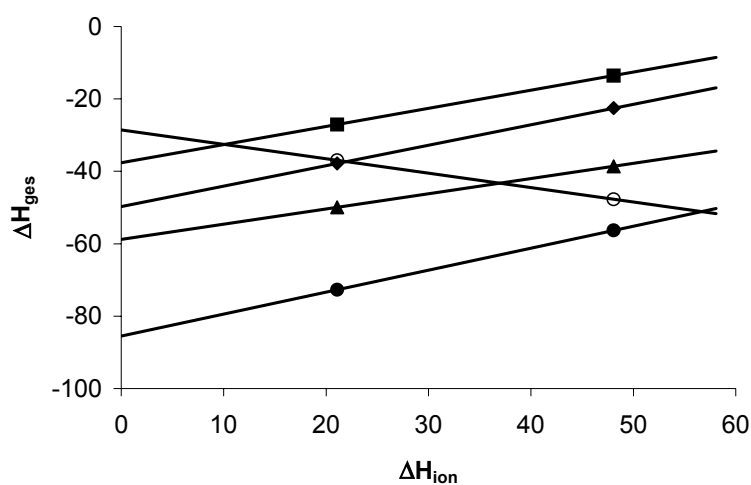


Abbildung 22. Auftragung der gemessenen Enthalpie ΔH_{ges} gegen die Ionisierungsenthalpie ΔH_{ion} . Die Anzahl n der vom Puffer übertragenen Protonen ergibt sich aus der Steigung der Geraden und

die korrigierte Enthalpie ΔH_x aus dem Achsenabschnitt auf der Ordinate ΔH_{ges} . ○ Sorbinil, ♦ HD04, ■ Tolrestat, ▲ IDD594, ● IDD393.

Es zeigt sich durch Auswertung der Abbildung 22, dass bei der Reaktion von Sorbinil mit hAR im Mittel 0,4 Protonen vom Puffer aufgenommen werden, die wiederum bei der Bildung des Komplexes vom Enzym-Ligand-System abgegeben werden. Bei der Komplexbildung aller übrigen Inhibitoren vom Carbonsäuretyp werden im Mittel 0,4 bis 0,6 Protonen während des Bindungsschritts vom Enzym-Ligand-System aufgenommen.

Tabelle 18. Korrektur ($\Delta H_x = \Delta H_{\text{ges}} - n\Delta H_{\text{ion}}$) der gemessenen Wärmetönungen ΔH_{ges} um die Ionisierungsenthalpien ΔH_{ion} , die vom verwendeten Puffer herrühren. Die Werte sind der Auftragung in Abbildung 22 entnommen. Positive n -Werte deuten auf eine Protonenaufnahme des Enzym-Ligand-Systems hin.

Substanz	n	ΔH_x (kJ mol ⁻¹)
Sorbinil	-0,4	-28,6
HD04	0,6	-49,7
Tolrestat	0,5	-37,7
IDD594	0,4	-58,8
IDD393	0,6	-85,5

4.6.2.2 Ionisierung von funktionellen Gruppen

Die Korrektur der gemessenen Wärmetönung ΔH_{ges} um die Ionisierungsenthalpie ΔH_{ion} des Puffers ergibt die Enthalpie ΔH_x (Abbildung 22 und Tabelle 18). Als weiterer Korrekturterm muss noch die Ionisierungsenthalpie der funktionellen Gruppe des Liganden bzw. des Proteins, die während der eigentlichen Bindungsreaktion protoniert bzw. deprotoniert wird, berücksichtigt werden. Um welche Gruppe(n) es sich dabei handelt, hängt also vom postulierten Bindungsmechanismus der Liganden ab (s. Kapitel 4.6.3). Für den Inhibitor IDD594 ist aus der hochaufgelösten Röntgenstrukturanalyse bekannt, dass er in deprotonierter Form bindet. Es ist anzunehmen, dass dies auch für die übrigen Inhibitoren vom Carbonsäuretyp gilt. Aufgrund ihrer niedrigen pK_A -Werte (IDD594: $pK_A \approx 2,90$) werden diese Inhibitoren bereits vor der Bindung an Aldose Reduktase als Carboxylate in Lösung vorliegen, d.h. ihr Protonierungszustand ändert sich bei der Bindung nicht. Welche funktionelle Gruppe des Proteins protoniert wird ist Gegenstand der Diskussion (Kapitel

4.6.4). Der pK_A -Wert von Sorbinil liegt nach einer Berechnung mit der ACD Solaris Software bei $8,67 \pm 0,20$. Damit ergibt sich nach der Henderson-Hasselbalch-Gleichung, dass in einem wässrigen Puffersystem bei pH 8,0 etwa 80% des Sorbinils protoniert vorliegen. Unter der Annahme, dass Sorbinil deprotoniert an Aldose Reduktase bindet, muss die gemessene Enthalpie ΔH_{ges} zusätzlich zur Korrektur der Ionisierungsenthalpie ΔH_{ion} des Puffers aufgrund der teilweisen Deprotonierung ($n = -0,8$) um einen Teil der Ionisierungsenthalpie ΔH_i für Sorbinil korrigiert werden (s. Tabelle 19). Die Ionisierungsenthalpie von Hydantoin als Modellverbindung für Sorbinil wurde gemessen (siehe Kapitel 6.3.4.4). Die Verwendung einer Modellverbindung war aufgrund der zu geringen Löslichkeit von Sorbinil notwendig. Die Ionisierungsenthalpie ΔH_i bezieht sich auf die Deprotonierung der funktionellen Gruppe.

Gleichung 4
$$\Delta H_{\text{bind}} = \Delta H_x + n \cdot \Delta H_i$$

Tabelle 19. Korrektur (nach Gleichung 4) der Enthalpie ΔH_x um die für die Modellverbindung gemessene Ionisierungsenthalpie ΔH_i , die von der ionisierbaren funktionellen Gruppe des Liganden herrührt.

Ligand	ΔH_x (kJ mol ⁻¹)	n	ΔH_i (kJ mol ⁻¹)	ΔH_{bind} (kJ mol ⁻¹)
Sorbinil	-28,6	-0,8	27,0	-50,2

4.6.2.3 Thermodynamische Daten nach Berücksichtigung der Korrekturterme

Unter der Voraussetzung, dass keine weiteren Prozesse, die Wärme freisetzen oder absorbieren, der eigentlichen Bindungsreaktion überlagert sind, ist die so erhaltene intrinsische Bindungsenthalpie ΔH_{bind} die Netto-Reaktionsenthalpie des Assoziationsschrittes zwischen Ligand und Protein bei 25 °C. Alle bisher noch nicht berücksichtigten Effekte (z.B. Protonierung des Proteins) können als identisch für alle untersuchten Liganden betrachtet werden (vgl. Kapitel 4.6.4.3). Daher kann ein relativer Vergleich der thermodynamischen Parameter erfolgen.

Ausgehend von dieser Enthalpie ΔH_{bind} kann der entropische Beitrag $-T\Delta S$ nach Gleichung 19 berechnet werden. Als Bindungskonstante K bzw. Freie Enthalpie ΔG wurden die aus beiden Puffern bestimmten Mittelwerte verwendet.

Tabelle 20. Thermodynamische Parameter ΔH_{bind} , ΔG , $-T\Delta S$ und K der untersuchten Liganden für die Bindung an humane Aldose Reduktase. Die Bindungskonstanten K sind Mittelwerte aus den Messungen in TRIS- und HEPES-Puffer. Bei IDD393 wurde K nur in TRIS-Puffer bestimmt, da die Messung in HEPES aufgrund der Steilheit der Bindungsisotherme nicht auswertbar war. Nach Gleichung 2.18 ergibt sich die Freie Enthalpie ΔG , während der entropische Term $-T\Delta S$ die Differenz aus der Freien Enthalpie ΔG und der Enthalpie ΔH_{bind} beschreibt. Die Enthalpien ΔH_{bind} sind die um die Ionisierungsenthalpien korrigierten Enthalpien.

Substanz	K (10^6 M^{-1})	ΔG (kJ mol^{-1})	ΔH_{bind} (kJ mol^{-1})	$-T\Delta S$ (kJ mol^{-1})
Sorbinil	17,8	-41,4	-50,2	8,8
HD04	0,4	-32,1	-49,7	17,6
Tolrestat	20,5	-41,7	-37,7	-4,0
IDD594	73,8	-44,9	-58,8	13,9
IDD393	173	-47,0	-85,5	38,5

4.6.3 Oxidationszustand des Kofaktors

Um die in anderen Arbeiten beobachtete Abhängigkeit der Inhibitor-Bindung vom Oxidationszustand des Kofaktors zu untersuchen, wurden ITC-Experimente mit dem Kofaktor sowohl in der reduzierten (NADPH) als auch in der oxidierten Form (NADP⁺) durchgeführt. Der Kofaktor wurde im Überschuss eingesetzt, da die Bindung der Inhibitoren an das Holo-Enzym studiert werden sollte. Tabelle 21 zeigt die mit den Inhibitoren Sorbinil und IDD594 erhaltenen Werte.

Tabelle 21. Kalorimetrisch bestimmte Bindungskonstanten und freie Enthalpien für die Bindung der Inhibitoren Sorbinil und IDD594 an die Holo-Enzyme hAR·NADP⁺ bzw. hAR·NADPH. Die Messungen wurden in TRIS-Puffer bei pH 8,0 durchgeführt.

Substanz	NADP ⁺		NADPH	
	K (10 ⁶ M ⁻¹)	ΔG (kJ mol ⁻¹)	K (10 ⁶ M ⁻¹)	ΔG (kJ mol ⁻¹)
Sorbinil	21,5±3,2	-41,9±0,4	1,3±0,0	-34,9±0,0
IDD594	77,0±32,7	-45,0±1,1	7,5±0,4	-39,2±0,1

Bei beiden Inhibitoren ist die Bindung an den NADP⁺-Komplex bevorzugt. Die Bindungskonstante K liegt für beide Inhibitoren bei der Bindung an hAR·NADP⁺ um eine Größenordnung höher als bei der Bindung an hAR·NADPH.

Für den Inhibitor IDD594 wurden die Messungen mit NADP⁺ bzw. NADPH in HEPES-Puffer wiederholt, um Änderungen des Protonierungszustandes bei der Bindung des Inhibitors zu untersuchen (s. Tabelle 22). Während bei den Messungen mit NADP⁺ eine mittlere Aufnahme von 0,4 Protonen bei der Komplexbildung zu beobachten ist, zeigen die Messungen mit NADPH keine Abhängigkeit der Enthalpie vom verwendeten Puffersystem, d.h. bei der Bindung von IDD594 an das hAR·NADPH Holo-Enzym werden keine Protonen zwischen dem Puffer und dem Enzym-Ligand-Komplex ausgetauscht.

Tabelle 22. Bindungskonstanten und freie Enthalpien für die Bindung des Inhibitors IDD594 an die Holo-Enzyme hAR·NADP⁺ bzw. hAR·NADPH. Die Messungen wurden in TRIS- bzw. HEPES-Puffer bei pH 8,0 durchgeführt. Die Enthalpie ΔH_{bind} ist um die Ionisierungsenthalpien korrigiert ($\Delta H_{\text{bind}} = \Delta H_{\text{ges}} - n\Delta H_{\text{ion}}$). Ein positiver n-Wert verweist auf eine Protonenaufnahme des Enzym-Ligand-Systems bei der Bildung des Komplexes.

Kofaktor	K (10 ⁶ M ⁻¹)	ΔG (kJ mol ⁻¹)	ΔH_{bind} (kJ mol ⁻¹)	n	-T ΔS (kJ mol ⁻¹)
NADP⁺	73,8	-44,9	-58,8	0,4	13,9
NADPH	7,2	-39,2	-61,3	0,0	22,1

4.6.4 Diskussion

4.6.4.1 Enthalpische und entropische Beiträge zur Bindungsenergie

Wie bereits einleitend erwähnt, sind bei der Beschreibung der Energetik einer Bindungsreaktion immer zwei Zustände in Betracht zu ziehen und relativ miteinander zu vergleichen: den Zustand vor der Bindung und den Zustand nach der Bindung.

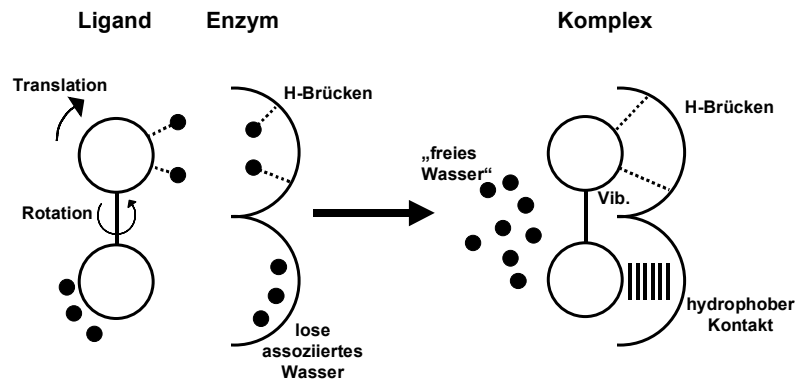


Abbildung 23. Schematische Darstellung von Protein-Ligand-Wechselwirkungen. Vor der Bindung ist der Ligand frei beweglich und entfaltet seine Flexibilität. Ligand und Enzym sind solvatisiert, wobei einige Wassermoleküle über Wasserstoffbrücken (gestrichelte Linien) verknüpft, andere lose assoziiert sind. Bei der Bindung (rechts) gehen Rotations- und Translationsfreiheitsgrade verloren. Die Erniedrigung der Entropie ist dabei ungünstig für die Bindung. Die Bindung des Liganden führt zu neuen Wasserstoffbrücken und hydrophoben Kontakten. Wasser wird dabei freigesetzt. Zusätzlich entstehen niederfrequente Schwingungsmoden, die auf die neu gebildeten nichtkovalenten Wechselwirkungen zurückzuführen sind. Nach (Andrews et al. 1984).

Das größte Problem, genaue Werte für die Bindungsenergien von biophysikalischen Assoziationsreaktionen vorherzusagen, liegt darin, dass diese Bindungsenergien aus Energiedifferenzen zwischen Molekülen in Lösung, die mit freien Wassermolekülen wechselwirken, und gebundenen Molekülen, die im Komplex miteinander wechselwirken, entstehen.

Wasserstoffbrücken. Schon vor der eigentlichen Bindungsreaktion sind die polaren Gruppen des Proteins und des Liganden durch Wasserstoffbrücken mit den Wassermolekülen in ihrer Umgebung abgesättigt. Durch Bindung des Liganden an das Protein gehen diese Wechselwirkungen zwar verloren, aber es werden auch neue intermolekulare polare Kontakte gebildet. Eine aufgrund der Komplexbildung neu ausgebildete Wasserstoffbrücke wird nur

dann konstruktiv zur Bindung beitragen, wenn die Desolvatisierungsenthalpie der polaren Gruppe durch die Enthalpie der neu gebildeten intermolekularen Wasserstoffbrücken überkompensiert wird. Demgegenüber kann sich eine polare Gruppe, die vor der Bindungsreaktion vollständig solvatisiert war, als enthalpisch ungünstig für die Bindungsreaktion erweisen, wenn sich im Komplex kein geeigneter Wechselwirkungspartner findet, der die Desolvatisierungsenergie kompensieren kann.

Entropie. Aufgrund der Assoziation zweier Moleküle kann erwartet werden, dass ein System Änderungen bezüglich der translatorischen, rotatorischen und internen Freiheitsgrade durchläuft. Zum Beispiel kann während der Bindung ein definierter Teil des Proteins seine Konformation verändern und „fester“ gefaltet werden, was mit einem Übergang zu höher frequenten Schwingungsmodi einhergeht, die durch ihre geringere energetische Anregung und damit ihre geringere Population weniger zur Entropie des Systems beitragen. Die Reduzierung interner Freiheitsgrade ist ein entropisch ungünstiger Beitrag zur Freien Bindungsenthalpie ΔG . Die Entropie nimmt ab, entsprechend einer negativen Entropieänderung.

Andererseits kann eine Region des Biomoleküls nach der eigentlichen Bindungsreaktion auch flexibler sein. Das wiederum führt zu einem positiven ΔS -Wert und begünstigt deshalb entropisch die Bindungsreaktion.

Wasser. Wassermoleküle organisieren sich in einer geordneten Struktur an der hydrophoben Oberfläche von Biomolekülen. Es wird angenommen, dass diese geordneten Wassermoleküle untereinander stärkere Wasserstoffbrücken ausbilden, als sie in hochgradig ungeordneten Wasserstrukturen gefunden werden. Das heißt, dass bei der Assoziation zweier Moleküle dieses Freisetzen von Wassermolekülen zur Freien Enthalpie des gesamten Prozesses beiträgt, weil das Wasserstoffbrückennetzwerk neu geordnet wird. Da die Freisetzung von Wassermolekülen in diesem Falle zwingend für die Reaktion ist, muss beachtet werden, dass ein Teil der gemessenen Enthalpie von der Freisetzung des Wassers herrührt.

Da zwangsläufig Oberflächenanteile bei einer Bindung vergraben werden, wird sich die Verteilung von an der Oberfläche gebundenen Wassermolekülen und freien Wassermolekülen verändern. Bei den meisten Bindungsreaktionen ist es diese Änderung der Solvenswechselwirkungen, die den entropischen Term dominiert. Wenn Wasser während der eigentlichen Bindung freigesetzt wird, das vorher mit hydrophoben Oberflächen wechselwirkte, kann außerdem eine günstige Entropieänderung für diese Reaktion beobachtet werden. Dieses gilt vor allem auch für solche Wassermoleküle, die vor der Ligandenbindung die Bindetasche des Proteins ausfüllen.

4.6.4.2 Faktorisierung der enthalpischen und entropischen Bindungsbeiträge der untersuchten AR-Inhibitoren

Wie sind die beobachteten enthalpischen und entropischen Beiträge im Rahmen dieser theoretischen Überlegungen zu interpretieren? Zur besseren Übersicht stellt Abbildung 24 die in Tabelle 20 aufgeführten thermodynamischen Größen in Form eines Balkendiagrammes dar.

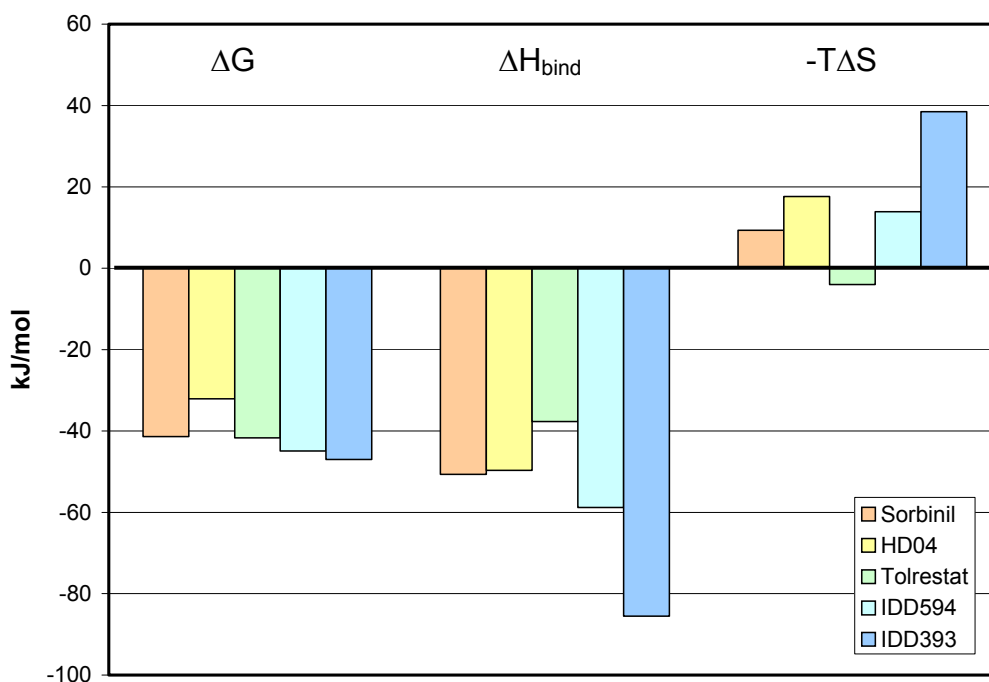


Abbildung 24. Balkendiagramm zur Gegenüberstellung der thermodynamischen Größen ΔH_{bind} , ΔG und $-T\Delta S$ der untersuchten Liganden für die Bindung an humane Aldose Reduktase.

Zunächst einmal ist anzumerken, dass es sich bei den thermodynamischen Daten nicht um Absolutwerte handelt! Wie Überlegungen zum Bindungsmechanismus ergeben (s. Kapitel 4.6.4.3), verändert sich bei der Ligandbindung der Protonierungszustand des Proteins. Die in Tabelle 20 aufgeführten Enthalpien sind bisher nicht um diesen unbekannten Beitrag korrigiert worden. Es erscheint allerdings plausibel, dass das Protein bei den Messungen mit NADP^+ für alle Inhibitoren die gleichen Protonierungszustände vor bzw. nach der Bindung des jeweiligen Inhibitors einnimmt. Der unbekannte Beitrag wäre demnach für alle Messungen mit NADP^+ gleich. Da dieser Beitrag als vermutlich exotherme Wärmetönung in allen ΔH_{bind} -Werten (noch) enthalten ist, wird sich eine veränderte Faktorisierung der ΔG -Werte in enthalpische und entropische Anteile ergeben (vgl. Abbildung 25). Dennoch können die

enthalpischen und entropischen Beiträge zur freien Enthalpie der Inhibitoren im Rahmen dieser Überlegungen relativ zueinander interpretiert werden.

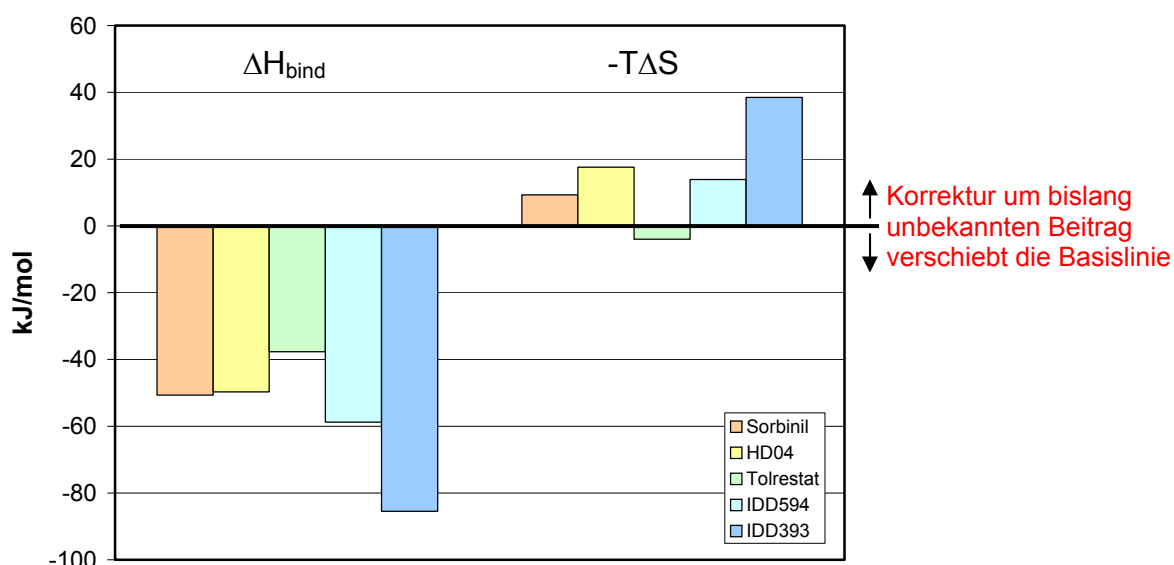


Abbildung 25. Die Korrektur um einen bislang unbekannten Beitrag aufgrund einer Änderung des Protonierungszustandes des Proteins verschiebt die Basislinie.

Die Enthalpiewerte streuen innerhalb der Serie um 47.8 kJ/mol, die Entropiebeiträge ($-T\Delta S$) um 42.5 kJ/mol. Sorbinil ist das einzige Hydantoin in der Reihe der untersuchten Inhibitoren. Verglichen mit den IDD-Inhibitoren bindet es schwächer enthalpisch, seine Bindung ist aber mit einem stärker negativen ΔH verknüpft als die Bindung von Tolrestat. Sorbinil geht eine Reihe von Wasserstoffbrückenbindungen und elektrostatische Wechselwirkungen im aktivem Zentrum ein, die zu dem enthalpischen Bindungsbeitrag Anlass geben könnten (s. Abbildung 26). Es sei aber daran erinnert, dass eine korrekte Faktorisierung in Absolutwerte nur möglich ist, wenn die mittlere Aufnahme von 0,5 Protonen durch das Protein geklärt und korrigiert ist. Wie in Kapitel 4.6.4.3 diskutiert wird, ist die Protonierung von Lys77 wahrscheinlich, bei den gegebenen pH Bedingungen und pK_A -Werten sollten im molaren Mittel 0,5 Protonen übertragen werden. Dieser Schritt kann als exotherme Reaktion mit ca $-22,5$ kJ/mol (Ionisierungsenergie von Lys = -45 kJ/mol (Chaplin 2002), multipliziert mit dem Faktor 0,5) angenommen werden. Vergleicht man die entropischen Bindungsanteile relativ zueinander, fällt Sorbinil in einen mittleren Bereich. Es ist vergleichbar mit HD04 und IDD594. Deutlich abweichend sind Tolrestat (größter entropisch begünstigender Beitrag) auf der einen Seite und IDD393 (größter die Bindungsenergie reduzierender entropischer Beitrag). Sorbinil ist das starrste Molekül der Serie und sollte von daher kaum Torsionswinkel-Freiheitsgrade bei der

Bindung an AR verlieren. Dennoch gewinnt Sorbinil gegenüber den größeren Inhibitoren vom Carbonsäure-Typ durch den entropischen Beitrag nicht soviel, wie zu erwarten war. Dies mag zum einen daran liegen, dass IDD594, IDD393 und Tolrestat bei ihrer Bindung durch die Besetzung von Spezifitätstaschen eine Reihe von Wassermolekülen verdrängen. Wie oben dargestellt, führt dies zu einem günstigen entropischen Beitrag, da freie Wassermoleküle im Solvens (*bulk water*) nicht so geordnet sind, wie in der Nähe einer hydrophoben Oberfläche.

Ein weiterer Aspekt könnte die nach der Bindung verbleibende Beweglichkeit der Inhibitoren in der Bindetasche sein. Das deprotonierte Sorbinil bindet sehr fixiert in das aktive Zentrum: Neben drei Wasserstoffbrückenbindungen zu Tyr48, His110 und Trp111 ist eine elektrostatische Wechselwirkung der zweiten, partiell negativ geladenen C=O-Gruppe mit NADP^+ wahrscheinlich. Für die Inhibitoren vom Carbonsäure-Typ hingegen zeigt die IDD384-Komplexstruktur, dass eine alternative Orientierung der COO^- -Gruppe möglich ist. Abbildung 26 stellt die kristallographisch beobachteten Orientierungen im aktivem Zentrum gegenüber. Da IDD384 bei pH 5,0 kokristallisiert wurde (PDB-Code 1el3) und einen pK_A von 4,6 hat, nahm man zunächst an, der Grund für die alternative Orientierung könne die teilweise Protonierung der Carboxylat-Gruppe sein (Calderone, Chevrier et al. 2000). IDD594 jedoch bindet beim gleichen pH deprotoniert, wie später die hochaufgelöste Struktur zeigen konnte. Heute erscheint die bei IDD384 zu beobachtende Wechselwirkung mit NADP^+ als plausible Erklärung. In der Summe ihrer Wechselwirkungen ähneln die beiden Orientierungen der COO^- -Gruppe den Wechselwirkungen des Sorbinils (PDB-Code 1ah0) mit den Aminosäuren des Proteins im aktiven Zentrum. Vermutlich liegt ein Gleichgewicht zwischen beiden Orientierungen vor, was zu einer höheren Beweglichkeit und damit zu einem günstigeren entropischen Beitrag führt. Neueste kristallographische Erkenntnisse bestätigen diese Vermutung. Die Kristallstruktur der hAR mit dem Inhibitor IDD552 zeigt zwei alternative Konformationen der Carboxylat-Gruppe des Inhibitors in der Anionen-Bindetasche, die im wesentlichen den beiden Orientierungen in den Kristallstrukturen mit IDD594 und IDD384 entsprechen (persönliche Mitteilung F. Ruiz).

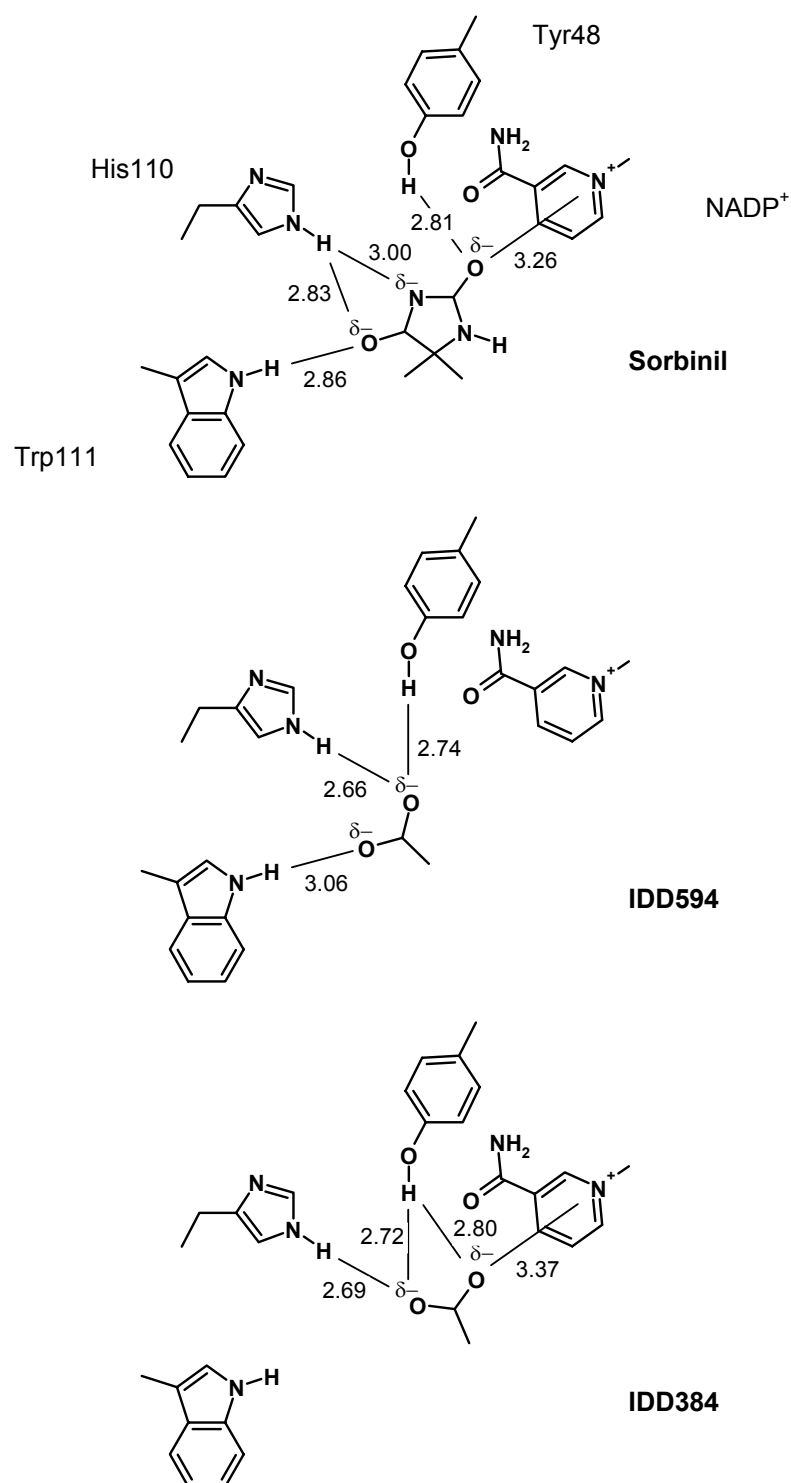


Abbildung 26. Schematische Darstellung der Interaktionen zwischen den Inhibitoren Sorbinil, IDD594 und IDD384 und den Aminosäuren Tyr48, His110 und Trp111 bzw. dem Kofaktor NADP⁺ im Bereich des aktiven Zentrums (Anionen-Bindetasche). Der Vergleich der Kristallstrukturen mit IDD594 und IDD384 offenbart zwei unterschiedliche Orientierungen der Carboxylat-Gruppe im aktiven Zentrum. In der Summe ihrer Wechselwirkungen ähneln die beiden Orientierungen den Wechselwirkungen des Sorbinils mit den Aminosäuren des Proteins. Distanzen gemessen zwischen Heteroatomen.

Die beiden vom *Institute for Diabetes Discovery* entwickelten Inhibitoren IDD594 und IDD393 zeichnen sich durch einen fast identischen Bindungsmodus aus. Bei den thermodynamischen Daten zeigt sich allerdings, dass IDD393 einen deutlich günstigeren enthalpischen Beitrag zur Bindung (-85,5 kJ/mol) aufweist als IDD594 (-58,8 kJ/mol), was allerdings durch einen ungünstigeren entropischen Beitrag (IDD393: +38,5 kJ/mol gegen IDD594: +13,9 kJ/mol) zum großen Teil wieder kompensiert wird. Vergleicht man die chemische Struktur von IDD594 mit der von IDD393, dann fällt als wesentlicher Unterschied der Ersatz der Halogen-Substituenten in ortho- und para-Position durch eine Nitro-Gruppe in meta-Stellung des Benzyl-Restes, der in die hydrophobe Spezifitätstasche des Enzyms bindet, auf. In der Kristallstruktur mit IDD393 (bislang unveröffentlicht) konnte eine Wasserstoffbrücken-Bindung zwischen der Nitro-Gruppe des Inhibitors und der NH Gruppe von Leu300 beobachtet werden (persönliche Mitteilung von F. Ruiz). Diese gerichtete Wechselwirkung trägt zu einer günstigeren Enthalpie bei. Andererseits kann eine solche gerichtete Wechselwirkung auch zur Verringerung der Beweglichkeit des Inhibitors IDD393 im Vergleich zu IDD594 in der Bindetasche führen, was den ungünstigeren entropischen Beitrag für IDD393 erklären könnte.

Im Vergleich zu den übrigen Inhibitoren des Datensatzes besitzt Tolrestat einen relativ geringen enthalpischen Beitrag (-37,7 kJ/mol), dafür aber den günstigsten entropischen Beitrag (-4,0 kJ/mol) zur Freien Enthalpie. Bei der Betrachtung der Kristallstrukturen (vgl. auch Kapitel 3.2 und 4.1) gibt es einige auffällige Unterschiede: (1) Die Konformation der Schleife Val297-Cys303 bleibt im Vergleich zur Holo-Struktur bei Ausbildung der Tolrestat-Spezifitätstasche erhalten, während die Konformation des Protein-Rückgrates in diesem Bereich zur Bindung der IDD-Verbindungen geändert wird. (2) Die Tolrestat-Spezifitätstasche ist weniger vergraben als die von den IDD-Verbindungen besetzte Spezifitätstasche, was eine geringere Änderung der Solvens-zugänglichen Oberfläche bei der Bindung mit sich bringt. (3) Die Bindung von Tolrestat scheint zu einer Erhöhung der Unordnung im Bereich der Schleife Val297-Cys303 zu führen, wie ein Vergleich der mittleren B-Faktoren (s. Tabelle 23) zeigt.

Tabelle 23. Mittlere B-Faktoren in Å². Berechnet jeweils für die Schleife Val297-Cys303 und für das gesamte Protein.

Struktur	Schleife Val297-Cys303		Gesamtes Protein	
	Rückgrat	Seitenketten	Rückgrat	Seitenketten
1ah0	34,9	44,5	34,0	36,8
1ah3	47,6	56,7	37,6	40,8
1ah4	38,4	48,5	38,0	41,5

Vergleicht man aber die für die Schleife Val297-Cys303 berechneten mit den für das gesamte Protein berechneten mittleren B-Faktoren, dann fällt auf, dass einzig bei der Tolrestat-Struktur (1ah3) eine deutliche Erhöhung der mittleren B-Faktoren zu beobachten ist. Zwar zeigen auch die Holo-Struktur (1ah4) und die Sorbinil-Struktur (1ah0) eine Erhöhung der mittleren B-Faktoren der Seitenketten-Atome im Bereich der Schleife Val297-Cys303, allerdings nicht in dem Ausmaß wie bei der Tolrestat-Struktur. Dies erklärt möglicherweise den günstigen entropischen Beitrag zur Bindungsenergie des Tolrestat.

Der Inhibitor HD04 zeigt mit $-49,7$ kJ/mol einen enthalpischen Beitrag zur Bindungsenergie, der günstiger ist, als der für Tolrestat gemessene Wert. Allerdings wird das durch einen ungünstigen entropischen Beitrag soweit kompensiert, dass HD04 die geringste freie Enthalpie des vermessenen Satzes von Inhibitoren aufweist. Die Struktur von HD04 im Komplex mit hAr konnte durch Kokristallisation aus Ammonium-Citrat Puffer aufgeklärt werden (s. Kapitel 4.5). Da aber die ITC-Experimente ohne Citrat durchgeführt wurden, ist keine Interpretation in struktureller Hinsicht möglich. Der Bindungsmodus von HD04 ohne Citrat ist unbekannt.

4.6.4.3 Mechanismus der Liganden-Bindungsreaktion

Es ist bekannt, dass Inhibitoren vom Carbonsäure-Typ, wie für den Inhibitor Alrestatin gezeigt werden konnte, in Bezug auf die durch Aldose Reduktase katalysierte Reduktion von Aldehyd-Substraten nicht-kompetitiv sind. Andererseits sind sie aber kompetitive Inhibitoren der ebenfalls durch Aldose Reduktase katalysierten Oxidation von Alkoholen zu den entsprechenden Aldehyden (rückwärtsgerichtete Reaktion). Um dieses Verhalten zu erklären, wurde vorgeschlagen, dass geladene Inhibitoren (z.B. Carboxylate) zwar wie Substrate in das aktive Zentrum binden, allerdings erst nachdem der katalytische Zyklus durchlaufen wurde (Ehrig, Bohren et al. 1994). Demnach müssen sie bevorzugt an den $AR \cdot NADP^+$ -Komplex binden, während Substrate bevorzugt an die reduzierte $AR \cdot NADPH$ -Form binden. Auch für den Inhibitor Sorbinil zeigen kinetische Daten, dass er sowohl an $AR \cdot NADPH$ als auch an $AR \cdot NADP^+$ bindet, wobei aber nur die Bindung an letzteren Komplex zu einer signifikanten Verringerung der Umsatzrate führt (Bohren et al. 2000).

Diese Schlussfolgerung wird durch die im Rahmen dieser Arbeit gesammelten thermodynamischen Daten untermauert. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl Inhibitoren vom Carbonsäure-Typ (IDD594) als auch vom Hydantoin-Typ (Sorbinil) deutlich stärker an den $hAR \cdot NADP^+$ -Komplex als an den $hAR \cdot NADPH$ -Komplex binden (s. Tabelle 21). Die Bindungskonstante K ist für beide Inhibitoren bei der Bindung an den $hAR \cdot NADP^+$ -Komplex um eine Größenordnung erhöht.

Interessant im Hinblick auf den Mechanismus der Liganden-Bindung sind auch die beobachteten Änderungen der Protonierungszustände bei der Bindung. Die Anzahl der vom Protein-Ligand-Komplex bei der Bindung aufgenommenen bzw. abgegebenen Protonen wurde für Inhibitoren von Carbonsäure- und Hydantoin-Typ, sowie für die oxidierte und reduzierte Form des Kofaktors bestimmt. Tabelle 24 fasst die Ergebnisse zusammen.

Tabelle 24. Experimentell beobachtete Änderungen der Protonierungszustände bei der Bindung von ARIs aus verschiedenen Klassen an hAR. Die Anzahl der vom ternären Protein-Ligand-Kofaktor-Komplex mit der Puffer bei der Bindung ausgetauschten Protonen wurde mit der oxidierten und der reduzierten Form des Kofaktors bestimmt. Positive Werte stehen für eine Protonenaufnahme, negative Werte für eine Protonenabgabe. Nach Abzug der Anzahl der mit dem Inhibitor ausgetauschten Protonen ergibt sich die durch eine Änderung des Protonierungszustandes der hAR zu erklärende Differenz.

Inhibitor-Klasse	Carbonsäure		Hydantoin
	NADP ⁺	NADPH	NADP ⁺
Oxidationszustand des Kofaktors	NADP ⁺	NADPH	NADP ⁺
Wahrscheinlicher Protonierungszustand des Inhibitors in Lösung bei pH 8,0	deprotoniert	deprotoniert	ca. 80% protoniert
Protonierungszustand des Inhibitors im Komplex	deprotoniert	deprotoniert	deprotoniert
Anzahl mit dem Protein-Ligand-Komplex ausgetauschter Protonen	0,5	0,0	-0,4
Anzahl mit dem Inhibitor ausgetauschter Protonen	0,0	0,0	-0,82
Differenz	0,5	0,0	0,42

Betrachten wir zunächst die Bindung eines Inhibitors vom Carbonsäuretyp an AR·NADP⁺. Aus den ITC-Experimenten geht hervor, dass bei der Bindung im Mittel 0,5 Protonen von dem Protein-Inhibitor-NADP⁺-Komplex aufgenommen werden. Aufgrund der hochaufgelösten IDD594-Komplexstruktur ist bekannt, dass IDD594 deprotoniert bindet. His110 und Tyr48 liegen nach der Bindung neutral vor. Lys77 ist protoniert und polarisiert die Tyr48 OH-Gruppe. Asp43 ist deprotoniert und geht elektrostatische Wechselwirkungen (Salzbrücken) mit NADP⁺ und Lys77 ein. Aufgrund ihrer generell niedrigen pK_A-Werte (2-5) ist davon auszugehen, dass Inhibitoren vom Carbonsäure-Typ bereits in wässriger Lösung deprotoniert vorliegen. Damit bleibt die Aufnahme von 0,5 Protonen durch Veränderungen im Protonierungszustand der Aminosäuren der Aldose Reduktase zu erklären. Wie liegt der Protein-Kofaktor-Komplex vor der Inhibitorbindung vor? Die räumliche Nähe des

Nicotinamid-Ringes von NADP^+ und Lys77 spricht dafür, dass die Basizität von Lys77 herabgesetzt sein könnte (s. Abbildung 27).

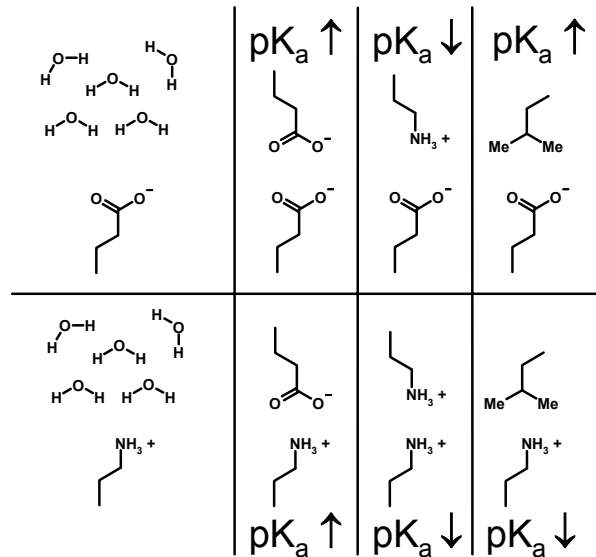


Abbildung 27. Schematische Darstellung der Effekte, die Nachbargruppen auf die Verschiebung von pK_A -Werten einer Carbonsäure oder Aminogruppierung ausüben können. Modifiziert nach (Dullweber 2000).

Demnach würde Lys77 neutral (deprotoniert) vorliegen und könnte eine H-Brückenbindung zu Asp43 eingehen, das seinerseits eine Salzbrücke zu NADP^+ ausbildet. Entscheidend für die Protonenaufnahme ist vermutlich eine pK_A -Verschiebung des Lys77. Da der Inhibitor mit seiner Carboxylat-Gruppe eine elektrostatische Wechselwirkung mit NADP^+ eingeht, wird der Einfluss des Kofaktors auf Lys77 verringert. Als Folge dessen steigt die Basizität des Lys77. Eine Verschiebung des pK_A -Wertes von Lys77 auf ~ 8 würde die Aufnahme eines halben Protons im Mittel erklären (Abbildung 28). Die direkte Protonen-Übertragung durch den Puffer ist denkbar, da das Protein auf seiner „Rückseite“ einen Wasserkanal ausbildet, der bei Asp43 endet (Cachau, Howard et al. 2000).

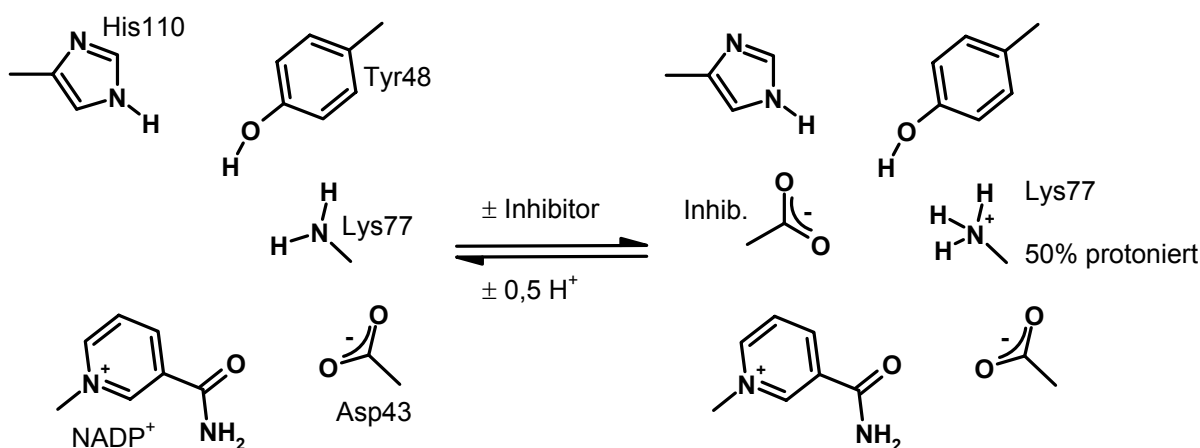


Abbildung 28. Vermutete Protonierungszustände in der AR-Bindetasche vor und nach Bindung eines Inhibitors vom Carbonsäure-Typ an AR·NADP⁺.

Ein alternativer Erklärungsansatz für die beobachtete Protonenaufnahme könnte eine pK_A -Verschiebung des His110 durch die Nähe der negativ geladenen Carboxylat-Gruppe des Inhibitors sein. Allerdings zeigt die hochaufgelöste Kristallstruktur eindeutig, dass His110 neutral vorliegt. Denkbar wäre höchstens, dass das Proton zwar von His110 aufgenommen wird, dann aber in Umkehrung des postulierten katalytischen Mechanismus weiter auf Lys77 übertragen wird.

Kommen wir nun zur Bindung eines Inhibitors vom Carbonsäuretyp an AR·NADPH. In diesem Fall stehen keine Informationen über den Protonierungszustand des ternären Komplexes aus einer hochaufgelösten Kristallstruktur zur Verfügung. Da der Kofaktor in seiner ungeladenen, reduzierten Form vorliegt, ist nicht davon auszugehen, dass es zu einer starken pK_A -Verschiebung des Lys77 kommt, so dass dieser Rest auch ohne gebundenen Inhibitor protoniert vorliegen wird. Stabilisiert wird diese Ladung durch eine mögliche Salzbrücke zum deprotonierten Asp43. Wie bereits erwähnt, ändert sich der Protonierungszustand des Inhibitors bei der Bindung nicht. Unsere Experimente belegen, dass sich auch der Protonierungszustand des Proteins nicht ändert, wodurch es insgesamt zu keinem Protonenaustausch zwischen der wässrigen Pufferlösung und dem Protein-Inhibitor-Komplex kommt (Abbildung 29).

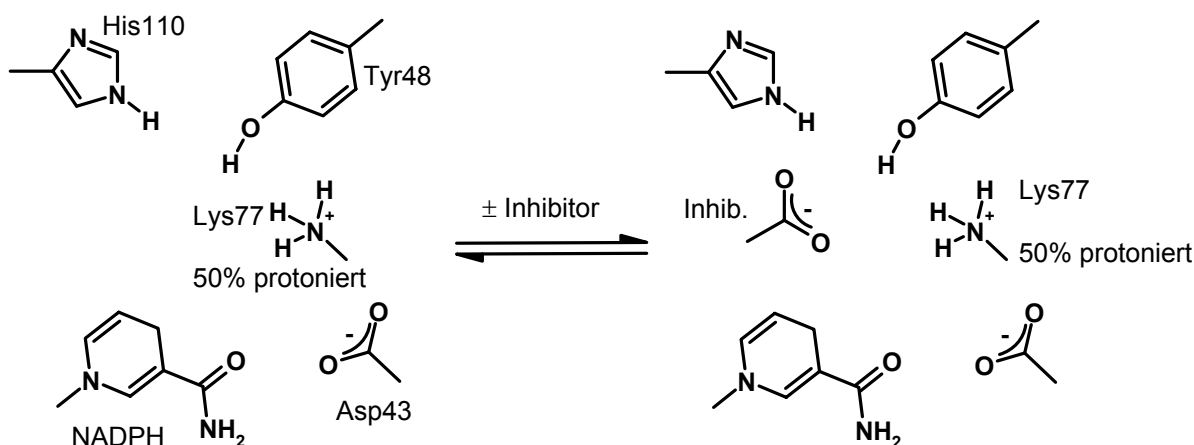


Abbildung 29. Vermutete Protonierungszustände in der AR-Bindetasche vor und nach Bindung eines Inhibitors vom Carbonsäure-Typ an AR-NADPH.

Bei der Bindung von Sorbinil an $\text{AR} \cdot \text{NADP}^+$ werden im Mittel 0,4 Protonen von dem Protein-Inhibitor-Komplex abgegeben. Der pK_A -Wert von Sorbinil liegt bei $8,67 \pm 0,20$. Nach der Henderson-Hasselbalch-Gleichung ergibt sich demnach, dass in einem wässrigen Puffersystem bei pH 8,0 etwa 80% des Sorbinils protoniert vorliegen. Unter der Annahme, dass Sorbinil deprotoniert an Aldose Reduktase bindet, werden vom Inhibitor im Mittel 0,8 Protonen bei der Bildung des Komplexes freigesetzt. Diese Annahme wird durch den Befund gestützt, dass Sorbinil genau wie IDD594 bevorzugt an $\text{hAR} \cdot \text{NADP}^+$ bindet. Gehen wir davon aus, dass ansonsten die gleichen Protonierungszustände vorliegen wie bei der Bindung einer Carbonsäure an $\text{AR} \cdot \text{NADP}^+$, dann ergibt sich unter Berücksichtigung der pK_A -Verschiebung des Lys77 eine Aufnahme von 0,5 Protonen bei der Komplexbildung durch das Protein. In guter Übereinstimmung mit dem Experiment verbleibt als Nettoeffekt eine mittlere Abgabe von ca. 0,3 Protonen (Abbildung 30).

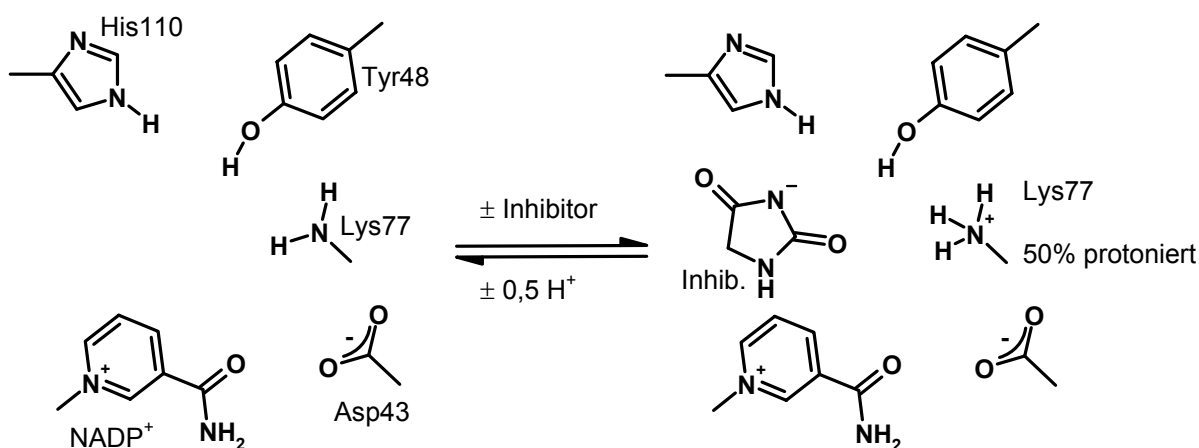


Abbildung 30. Vermutete Protonierungszustände in der AR-Bindetasche vor und nach Bindung eines Inhibitors vom Hydantoin-Typ an AR·NADP⁺.

Es muss angemerkt werden, dass die thermodynamischen Messungen mit großen Fehlern und damit die hier vorgestellte Interpretation mit einer großen Unsicherheit behaftet ist. Aufgrund des notwendigen Aufwands, der zur Bereitstellung ausreichender Mengen an Proteinmaterial getrieben werden musste, konnten einige Messungen nicht hinreichend oft wiederholt werden, um einen verlässlichen statistischen Mittelwert und Fehler zu bestimmen. Der Mangel an Proteinmaterial führte auch dazu, dass eine möglichst geringe Menge pro Messung verwendet wurde. Da dabei nahe an der Detektionsgrenze des Kalorimeters gearbeitet wurde, sinkt unweigerlich die Zuverlässigkeit der Messungen.

Alle hier vorgestellten Überlegungen müssen daher zum gegenwärtigen Zeitpunkt als erste Hinweise auf den Bindungsmechanismus gewertet werden. Die in sich schlüssige Interpretierbarkeit aller bisher gesammelten Daten im Rahmen der präsentierten Modellvorstellung und die gute Übereinstimmung mit anderen experimentellen Befunden stimmen zuversichtlich, dass das vorgeschlagene Modell durch zukünftige Messungen bestätigt und weiter untermauert werden kann. So wird es z.B. interessant sein zu sehen, ob sich eine veränderte Bilanz für die Änderung der Protonierungszustände ergibt, wenn die Messungen bei einem anderen pH durchgeführt werden. Werden diese Veränderungen im Rahmen der hier vorgestellten Modellvorstellung für den Mechanismus der Liganden-Bindung erklärbar sein, oder werden sie eine Anpassung des Modells erfordern? Darüber hinaus werden weitere Messungen mit anderen Inhibitoren notwendig sein, um ein vollständiges Bild der Liganden-Bindung zu erhalten.

5 Zusammenfassung und Ausblick

Thema der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der Inhibition des Enzyms Aldose Reduktase. Eine Besonderheit dieses Enzyms liegt in der ausgeprägten Anpassungsfähigkeit der Bindetasche bei der Ligandbindung. Das Ausmaß dieser Rezeptorflexibilität wurde durch den ausführlichen Vergleich bekannter Kristallstrukturen und mit Hilfe von molekulardynamischen Simulationen untersucht (Kapitel 4.1). Beim Vergleich der bekannten Kristallstrukturen zeigte sich, dass bislang nur vier unterschiedliche „Hauptkonformationen“ kristallographisch beobachtet wurden. Als Startstruktur für die MD-Simulationen wurde die Geometrie der Kristallstruktur der humanen Aldose Reduktase im Komplex mit dem Inhibitor IDD594 verwendet. Bei zwei der drei Simulationen wurde der Ligand zuvor aus der Startstruktur entfernt. Durch die verschiedenen MD-Simulationen war es möglich, eine Vielzahl weiterer Konformationen zu generieren, die „Zwischenzustände“ der bereits bekannten Konformationen darstellen. Bei der Analyse der MD-Trajektorien wurde der weitere der duale Charakter der AR-Bindetasche deutlich. Die Bindetasche kann in zwei Subtaschen unterteilt werden: Das rigide katalytische Zentrum (die Anionen-Bindetasche) und die hochflexible Region um Leu300, die wesentlich an der Ausbildung der hydrophoben Spezifitätstasche beteiligt ist. Interessant ist auch die Tatsache, dass während der MD-Simulationen, bei denen der Ligand aus der Startstruktur entfernt worden war, Konformationen auftraten, die anderen mit weiteren Inhibitoren kristallographisch beobachteten Konformationen sehr ähnlich sind. Dies zeigt, wie wertvoll MD-Simulationen zur Generierung eines Ensembles relevanter Proteinkonformationen sein können, gerade bei Ziel-Proteinen für die kaum Kristallstrukturen zur Verfügung stehen.

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war die Suche nach neuen Inhibitoren der Aldose Reduktase. Das virtuelle Screening wurde dabei zunächst auf die in der hochaufgelösten IDD594-Komplexstruktur beobachtete Proteinkonformation beschränkt. In diesem Ansatz wurde also die Flexibilität des Rezeptors vernachlässigt. Die Vorteile der IDD594-Komplexstruktur liegen (a) in der hohen Auflösung, die exakte Informationen über den Protonierungszustand von Protein und Ligand liefert, und (b) in dem Vorliegen einer hydrophoben Spezifitätstasche, deren Besetzung zu einer hohen Affinität und Spezifität der Liganden gegenüber eng verwandten Enzymen (wie z.B. der Aldehyd Reduktase) führt. Die Bindetasche wurde einer *Hot Spot*-Analyse unterzogen, um aus den dabei identifizierten bevorzugten Wechselwirkungsbereichen eine Pharmakophor-Hypothese abzuleiten, die für eine 3D-

Datenbanksuche verwendet wurde. Abschließend wurden die Kandidatenmoleküle flexibel in die Bindetasche eingepasst und einer visuellen Inspektion unterzogen.

Ebenfalls untersucht wurde, inwieweit es ein Ligand basierender Ansatz erlaubt, die Flexibilität des Rezeptors bei der virtuellen Datenbanksuche zu berücksichtigen (Kapitel 4.3). Die Idee war, bekannte Inhibitoren der Aldose Reduktase als Abbild der entsprechenden Proteinkonformationen zu verwenden. Die hier berücksichtigten Inhibitoren sind Stellvertreter für drei der vier zuvor erwähnten „Hauptkonformationen“ der Aldose Reduktase. Aus der Überlagerung der Inhibitoren wurde eine Pharmakophor-Hypothese abgeleitet und für die Datenbanksuche verwendet. Anschließend wurden die Inhibitoren vereinigt und als Referenz für die paarweise Überlagerung der Kandidatenmoleküle verwendet.

Aus beiden Datenbanksuchen konnten neue Inhibitoren der Aldose Reduktase mit Affinitäten im mikromolaren Bereich identifiziert werden. Das Ziel der durchgeführten virtuellen Datenbanksuchen war, Leitstruktur-ähnliche Verbindungen zu finden, deren Affinität in weiteren Design-Zyklen optimiert werden kann. Ein Beispiel dafür ist die Derivatisierung eines bereits bekannten Inhibitors (Kapitel 4.4). Das beste Derivat zeigt eine 30fach höhere Affinität als die Ausgangsverbindung. Die Struktur dieses Inhibitors im Komplex mit humaner Aldose Reduktase konnte aufgeklärt werden. Dabei wurde ein neuer Bindungsmodus beobachtet, bei dem ein Citrat-Molekül die Wechselwirkung des Inhibitors mit dem Protein verbrückt. Die Analyse dieser Wechselwirkungen kann in der Zukunft als Grundlage für eine neue Design-Strategie zur weiteren Verbesserung der Affinität dienen (Kapitel 4.5). Dies unterstreicht die Bedeutung des Zusammenwirkens von Computermethoden und Röntgenkristallographie bei der Entwicklung neuer Inhibitoren. Am Ende einer solchen Entwicklung könnten möglicherweise Inhibitoren mit einer vergleichbaren Affinität zu bereits bekannten Inhibitoren stehen.

Alle Verbindungen, die als Inhibitoren der Aldose Reduktase identifiziert werden konnten, sind Carbonsäuren. AR-Inhibitoren mit einer anderen terminalen funktionellen Gruppe konnten nicht gefunden werden. Allerdings wurden bislang nur Datenbanken mit einer sehr begrenzten Anzahl von Verbindungen durchsucht. Möglicherweise lassen sich weitere Inhibitoren in deutlich umfangreicheren Datenbanken finden. Die Suche in großen Datenbanken scheint zur Zeit nur mit dem auf eine, als rigide betrachtete, Proteinkonformation beschränkten Ansatz möglich. Die zur endgültigen Auswahl der

Testverbindungen notwendige visuelle Inspektion ist bei dem zuvor beschriebenen Ligand basierenden Ansatz, der implizit die Rezeptorflexibilität berücksichtigt, zu aufwendig, um die Anwendung dieser Suchstrategie auf größere Datenbanken zu erlauben.

Abhilfe könnte ein zusätzlicher Rezeptor basierender Filterschritt schaffen, der eine Abschätzung der Affinität (scoring) ermöglicht und es somit erlaubt, die Kandidatenmoleküle in eine Reihenfolge zu bringen (ranking). Bei einer zuverlässigen Abschätzung der Affinität kann die visuelle Inspektion dann auf die begrenzte Anzahl der am besten bewerteten Verbindungen beschränkt werden. Das Programm FLEXE erlaubt das Einpassen von Liganden in ein Ensemble von Proteinstrukturen und könnte in einem weiteren Filterschritt verwendet werden. Ein Testdatensatz aus AR-Inhibitoren mit bekannten Bindungsmodi wurde verwendet, um das Programm FLEXE zu testen. Dabei hat sich gezeigt, dass die experimentellen Bindungsmodi nicht zuverlässig mit FLEXE reproduziert werden konnten. Anzumerken ist, dass das verwendete Ensemble auf lediglich drei Proteinstrukturen begrenzt war. Möglicherweise können bessere Ergebnisse bei Verwendung eines größeren Ensembles, angereichert mit weiteren Proteinkonformationen (z.B. aus den MD-Simulationen), erreicht werden. Die Vergrößerung des Ensembles hat allerdings Grenzen, da sie zu einer Erhöhung der Rechenzeiten führt. Ebenfalls zu testen ist, ob das *ranking* der generierten Docking-Lösungen durch eine Anpassung der verwendeten Bewertungs-Funktion verbessert werden kann. Um eine korrekte Abschätzung der Bindungsenergie zu ermöglichen, muss jedoch das Programm zunächst überhaupt in der Lage sein, Lösungen zu generieren, die dem experimentell beobachteten Bindungsmodus nahe kommen, da das Scoring von der zugrundeliegenden Proteinkonformation abhängt (Marelius et al. 2001).

Eine Alternative zum Docking in multiple Proteinkonformationen mit FLEXE könnte die Verwendung des Programms AUTODOCK sein. Dabei werden gemittelte, energiegewichtete Gitter zur Beschreibung multipler Proteinkonformationen eingesetzt (Österberg et al. 2002). AUTODOCK lässt sich auch mit DRUGSCORE Potenzial-Feldern verwenden (Sottriffer et al. 2002).

Ein weiteres prinzipielles Problem beim Docking in Ensemble von Proteinstrukturen liegt darin, dass bislang keine Bewertungs-Funktion einen Beitrag zur freien Bindungsenergie aufgrund einer Konformationsänderung des Proteins erfassen kann. Die Frage, wie groß ein solcher Beitrag ist, kann möglicherweise in der Zukunft durch temperaturabhängige

mikrokalorimetrische Untersuchungen der Ligandbindung erreicht werden. Allerdings nur, falls der entsprechende enthalpische Beitrag groß genug ist, um eine Detektion zu erlauben.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden ITC-Messungen bei pH 8,0 und bei 25°C mit einer Reihe von AR-Inhibitoren durchgeführt, um ein thermodynamisches Profil der Bindung des jeweiligen Inhibitors zu erhalten (Kapitel 4.6). Nach der Berücksichtigung von Korrekturtermen für die Ionisierung des Puffers und funktioneller Gruppen des Liganden, war eine strukturbezogene Interpretation der erhaltenen thermodynamischen Daten möglich. Anhand der in Abhängigkeit von dem Oxidationszustand des Kofaktors beobachteten Protonierungsänderungen bei der Ligandbindung konnten Rückschlüsse auf den Ligand-Bindungsmechanismus gezogen werden. Eine Hypothese über den Protonierungszustand des Proteins vor und nach der Bindung der verschiedenen Liganden wurde abgeleitet. Diese erlaubt die Betrachtung der beobachteten Effekte in einem einheitlichen Bild und steht im Einklang mit anderen experimentellen Befunden. Die Untersuchung weiterer Inhibitoren bei einem anderen pH-Wert wird nötig sein, um das Bild der Liganden-Bindung abzurunden.

Welche anderen Ansätze gibt es für die zukünftige Suche nach Inhibitoren der Aldose Reduktase mit neuen funktionellen Gruppen, die die Anionen-Bindetasche besetzen? Eine Möglichkeit könnte in der gezielten Suche nach 2,4-Thiazolidindionen (Glitazonen) bestehen. Verbindungen aus dieser Substanzklasse inhibieren nicht nur Aldose Reduktase, sondern besitzen auch eine antihyperglykämische Wirkung, da sie auf PPAR γ (*peroxisome proliferator-activated receptor γ*) wirken und die Empfindlichkeit gegenüber Insulin steigern (s. Kap. 3.3.1). Die Entwicklung von Glitazonen, die unter Erhalt der Wirkung auf PPAR γ auch Aldose Reduktase inhibieren, könnte den Zugang zu einer neuen Klasse von oral wirksamen Antidiabetika eröffnen, die (1) den Blutzuckerspiegel senken und (2) der Entstehung von Spätfolgen vorbeugen.

Ein weiterer Ansatzpunkt ist der duale Charakter der AR-Bindetasche, die neben der sehr rigiden Anionen-Bindetasche eine sehr flexible Region aufweist, die die Ausbildung der verschiedenen hydrophoben Spezifitätstaschen ermöglicht. Grundlage einer zukünftigen Design-Strategie könnte die getrennte Suche und Optimierung von Fragmenten für die Anionen-Bindetasche und die hydrophobe Spezifitätstasche sein, um diese anschließend zu einem potenten Inhibitor zu verknüpfen. Der Vergleich der in dieser Arbeit getesteten Verbindungen macht deutlich, dass eine ausreichende Flexibilität in dem verknüpfenden Teil (*linker*) der so entwickelten Inhibitoren essentiell für eine günstige Bindungsenergie ist, da nur dann eine optimale Platzierung der Fragmente in der jeweiligen Subtasche möglich sein wird.

6 Material und Methoden

6.1 Chemikalien und Enzym

Enzym. Aldose-Reduktase wurde uns vom IGMBC (Illkirch, Frankreich) zur Verfügung gestellt. Nach Überexpression der mit einem Hexahistidin-Rest versehenen (his)₆-hAR im *E. coli* Stamm BL21(DE3) (Novagen) bei 37°C (bis OD_{600nm}=0,6) und Aufbrechen der Zellen mittels Ultraschallbehandlung, erfolgt die Aufreinigung in zwei säulenchromatographischen Schritten. Zunächst über eine Metall-Affinitäts-Säule (TALON, SuperflowTM, Clontech) und anschließend nach Abspaltung des Hexahistidin-Restes mittels Thrombin über eine Anionenaustauscher-Säule (DEAE Sephadex A-50, Pharmacia). Im letzten Schritt erfolgt der Austausch des zur Elution verwendeten Puffers gegen den bei den ITC-Messungen verwendeten Puffer und Einengung bis zu einer Proteinkonzentration von 5 mg/ml.

Inhibitoren. Die zu testenden Verbindungen aus den Datenbanksuchen wurden von dem in der Datenbank angegebenen Hersteller bezogen. Sorbinil und Tolrestat waren über das IGBMC zugänglich. Vom *Institute for Diabetes Discovery* wurden IDD370, IDD393 und IDD594 zur Verfügung gestellt.

Sonstige Chemikalien. Soweit es nicht explizit erwähnt wird, wurden die Reagenzien in der Qualität „pro analysi“ (p.a.) oder höherer Qualität bezogen. Der Kofaktor β -Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat wurde in reduzierter Form (NADPH, analytical grade, 98%) und in oxidierte Form (NADP⁺, analytical grade, >97%) als Natrium-Salz von SERVA (Heidelberg) bezogen. D-Xylose (>99%) wurde bei Sigma-Aldrich (Steinheim) erworben. Hydantoin (purum, ~97%) wurde von Fluka (Buchs) geliefert.

Wasser. Das verwendete Wasser wurde nach Entionisierung über einen Ionenaustauscher mit einer Reinstwasseranlage (PurelabTM Plus, ELGA ESF Deutschland GmbH) aufbereitet.

6.2 Enzymassay

Der in dieser Arbeit verwendete *in vitro* Enzymassay zur Bestimmung von IC_{50} -Werten beruht auf der Reduktaseaktivität der humanen Aldose Reduktase. Das Aldehyd-Substrat (z.B. D-Xylose) wird durch die hAR zum entsprechenden Alkohol reduziert. Dabei wird ein Hydrid vom C4-Atom des Nicotinamid-Teils des Kofaktors NADPH auf das Substrat übertragen. Der Kofaktor geht in seine oxidierte Form $NADP^+$ über. Die damit einhergehende Abnahme der Absorption bei 340nm kann mit einem UV-Spektrometer photometrisch verfolgt werden. In Abhängigkeit von der Konzentration des Inhibitors verläuft die Umsetzung des Substrates zeitlich verzögert ab, daraus resultiert eine entsprechend verlangsamte zeitabhängige Abnahme der Absorption durch NADPH.

Als IC_{50} ist die Inhibitorkonzentration definiert, bei der das Enzym eine um 50% verminderte Aktivität zeigt. Zur Bestimmung dieses Wertes werden sogenannte „Dosis-Aktivitäts-Diagramme“ (*dose-response-curves*) ausgewertet, bei denen auf der y-Achse die relative Änderung der Enzymaktivität im Vergleich zur nichtinhibierten Reaktion und auf der x-Achse die logarithmierte Inhibitorkonzentration aufgetragen ist (Copeland 1996). Gleichung 5 beschreibt die relative Änderung der Enzymaktivität in Abhängigkeit von der Inhibitorkonzentration.

Gleichung 5

$$y = \frac{R}{1 + \left(\frac{[I]}{IC_{50}} \right)^S} + h$$

S : Slopefaktor (Steilheit der Kurve)

R : Range (Maximum der Kurve)

$[I]$: Inhibitorkonzentration

h : Hintergrund

Als Maß für die Enzymaktivität wird die Geschwindigkeit der von dem Enzym katalysierten Reaktion verwendet, die proportional zur Steigung der Absorptionsänderung bei der jeweiligen Inhibitorkonzentration ist. Die Enzym- und Substratkonzentration ist bei allen Messungen gleich.

Zur Durchführung der Messung wurde für jeden Inhibitor eine Verdünnungsreihe angesetzt. Eine Stammlösung (in der Regel 1mM) des Inhibitors in einem Gemisch aus Phosphat-Puffer (100mM, pH 6,2) und bis zu 30 Vol% DMSO oder Ethanol wurde hergestellt und anschließend mit dem Phosphat-Puffer schrittweise jeweils um den Faktor 10 verdünnt.

Der Assay wurde bei 25°C in einer hochtransparenten Mikrotiterplatte mit 96 Reaktionsgefäßen (Greiner GmbH, Deutschland) durchgeführt. Die Absorption bei 340 nm wurde mit einem Plattenreader (iEMS Reader MF, Labsystems Oy, Finland) detektiert. Die

Reaktionsmischungen in den Reaktionsgefäßen hatten ein Volumen von 250 μL und bestanden aus Phosphat-Puffer (100 mM, pH 6,2) in dem NADPH (0,14 mM), D-Xylose (26,5 mM) und humane Aldose Reduktase (0,28 μM) gelöst waren. Die zu testenden Verbindungen wurden bei Konzentrationen von 0,8 mM bis 20 nM auf Inhibition getestet. Um die Mischungen anzusetzen, wurden nacheinander folgende Lösungen (s. Tabelle 25) nach dem dargestellten Schema (s. Abbildung 31) pipettiert.

Tabelle 25. Zusammensetzung der Reaktionsmischungen für den Enzymassay.

Reihenfolge	Substanz	Konzentration	Volumen
1	Phosphat-Puffer pH 6,2	100 mM	s. Schema
2	Inhibitor in Phosphat-Puffer	s. Schema	s. Schema
3	D-Xylose in Wasser (bidest.)	50 mg/ml	20 μL
4	NADPH in Wasser (bidest.)	3 mg/ml	10 μL
5	Aldose Reduktase in TRIS-Puffer (10 mM, pH 8,0)	0,125 mg/ml	20 μL

	1	2	3	4	Verdünnung
A	200 μl	150 μl	100 μl	50 μl	Stammlösung
B	200 μl	150 μl	100 μl	50 μl	1:10
C	200 μl	150 μl	100 μl	50 μl	1:100
D	200 μl	150 μl	100 μl	50 μl	1:1.000
E	200 μl	150 μl	100 μl	50 μl	1:10.000
F	MAX				

Puffervolumen

0 μl	50 μl	100 μl	150 μl	200 μL
-----------------	------------------	-------------------	-------------------	-------------------

MAX = Maximale Anfangsgeschwindigkeit ohne Inhibition

Abbildung 31. Schema zum Pipettieren der Lösungen. Jede Zelle steht für ein Reaktionsgefäß der Mikrotiterplatte. In jeder Zeile wird die angegebene Verdünnung der Inhibitor-Stammlösung verwendet. Das dabei eingesetzte Volumen ist von Spalte zu Spalte verschieden und in den Zellen angegeben. Die Farben symbolisieren mit welchem Puffervolumen aufgefüllt wird.

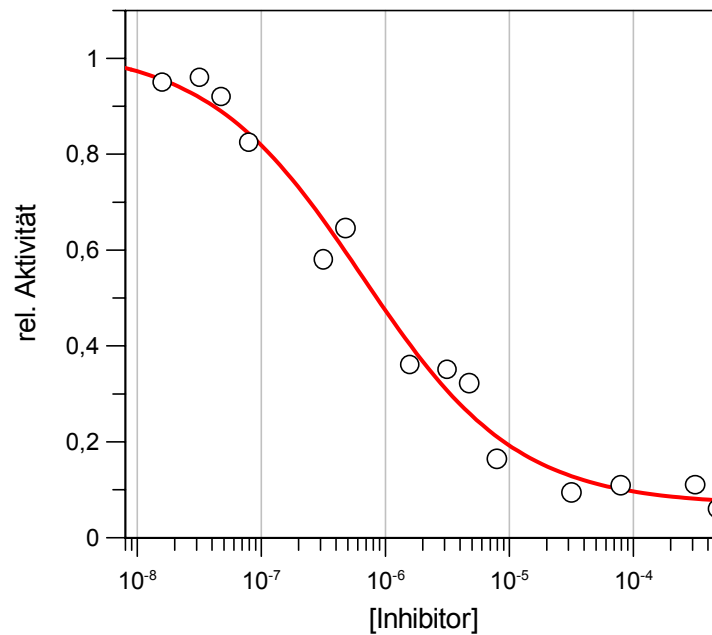


Abbildung 32. Dosis-Aktivitäts-Diagramm zur Bestimmung des IC_{50} -Wertes von Sorbinil.

Die Validierung des Assays erfolgte mit dem Inhibitor Sorbinil (s. Abbildung 32). Der IC_{50} -Wert von $0,65 \pm 0,15 \mu\text{M}$ fällt in den gleichen Bereich wie die in der Literatur angegebenen Werte ($3,5 - 0,15 \mu\text{M}$) (Kato, Nakayama et al. 1991; Poulsom 1987a; Poulsom 1987b; Sarges and Peterson 1986), die allerdings z.T. mit anderen Substraten oder dem Enzym aus Rind oder Ratte gemessen wurden.

Zur Auswertung der Dosis-Aktivitäts-Diagramme mittels nichtlinearer Regression wurde das Programm GRAFIT (LEATHERBARROW 1989-1999) verwendet. Der IC_{50} -Wert ergibt sich aus dem Wendepunkt der an die experimentellen Werte angepassten, sigmoidalen Kurve. Die Fehlergrenzen wurden anhand der nichtlinearen Regression ebenfalls mit GRAFIT bestimmt.

Um eine ausreichende Änderung der Absorption während der Reaktionszeit zu erreichen, wird zur Aktivitätsbestimmung eine relativ hohe Enzymkonzentration benötigt. Dies wiederum hat zur Folge, dass die freie Inhibitor-Konzentration (Menge des frei in Lösung vorliegenden Inhibitors) geringer ist als die ursprünglich eingesetzte Konzentration. Ein Teil des Inhibitors ist nach dem Massenwirkungsgesetz mit der Gleichgewichtskonstante K_i an das Enzym gebunden und liegt somit nicht mehr in Lösung als freier Inhibitor vor. Dieser Effekt macht sich allerdings erst bei Inhibitor-Konzentrationen im nanomolaren Bereich bemerkbar und konnte daher meist vernachlässigt werden.

6.3 Isothermale Titrationskalorimetrie

6.3.1 *Beschreibung des Gerätes*

Alle Messungen wurden mit dem MCS-ITC Kalorimeter der Firma MicroCal Inc. durchgeführt. Dieses Kalorimeter besitzt zwei Zellen, hergestellt aus einer chemisch resistenten Legierung, die jeweils ein Volumen von etwa 1,4 ml haben. Beide Zellen sind von einem adiabatischen Schutzschild umgeben, um Wärmeaustausch zwischen den Zellen und der Umgebung zu verhindern.

Eine der beiden Zellen dient als Referenzzelle. Sie ist bei Messungen in wässrigen Systemen mit destilliertem entgastem Wasser befüllt. In der zweiten Zelle, der Messzelle, findet die zu untersuchende Reaktion statt. Sie besitzt einen nach oben offenen Zugang zum Einführen der verwendeten Speziälspritze. Deren lange, frei drehbare Kanüle geht an ihrem Ende in ein kleines Rührblatt über. Dieses wird über einen Motor mit konstanter Geschwindigkeit gedreht und sorgt so für die Durchmischung der Lösung.

Sowohl die Zellen als auch der adiabatische Mantel besitzen voneinander unabhängige Thermometer und Heizelemente, welche die Temperaturdifferenzen sowohl zwischen den beiden Zellen selbst als auch zwischen Mantel und Zellen messen und konstant halten. Der Temperaturregelkreis zwischen den Zellen und dem sie umgebenden Schild verhindert einen Wärmeaustausch zwischen Zelle und Schild, indem es eventuell entstehende Temperaturdifferenzen kompensiert. Zur Konstanthaltung der Temperaturdifferenz zwischen den Zellen selbst wird während der Messung der Referenzzelle ein konstanter Heizstrom von etwa einem Milliwatt zugeführt. Die hierdurch auftretende Temperaturdifferenz zwischen Mess- und Referenzzelle aktiviert das Heizelement der Messzelle, welches versucht durch Wärmeabgabe in die Messzelle die während der Reaktion entstandene Temperaturdifferenz wieder auf Null zu bringen. Dieser eingesetzte Heizstrom, angegeben in $\mu\text{cal/s}$, dient als Messsignal der ITC und wird mittels eines PCs als Funktion der Zeit aufgezeichnet.

Je nach Art der in der Messzelle stattfindenden Reaktion erhält man unterschiedliche Signale. Findet nach dem Einspritzen eine exotherme Reaktion statt, so erwärmt sich die Messzelle stärker als die Referenzzelle und die Heizleistung der Messzellenheizung wird gedrosselt, um die Temperaturen anzugleichen. Man erhält ein negatives Signal. Handelt es sich jedoch um eine endotherme Reaktion, so muss der Heizstrom der Messzelle verstärkt werden. Es resultiert ein positives Signal.

Messungen mit diesem Gerät sind nur bei Reaktionstemperaturen oberhalb der Raumtemperatur zuverlässig möglich, da der Temperatureausgleich ausschließlich über Heizelemente erfolgt. Für Reaktionstemperaturen unterhalb der Raumtemperatur ist eine

Kühlung des Gerätes mittels eines Wasserbades unter Benutzung der eingebauten Kühlspiralen erforderlich und möglich. Um bei den Experimenten eine ausreichende Temperaturdifferenz zwischen Reaktions- und Raumtemperatur herzustellen, ist der Messraum mittels einer Klimaanlage auf 18°C temperiert.

Das Detektionslimit des Gerätes liegt bei ca. 0,5 µcal, was einer Temperaturänderung in der Messzelle von etwa 10^{-6} K entspricht. Eine Messung kann dann als ausreichend aufgelöst betrachtet werden, wenn die gemessene Peakhöhe mindestens 0,1 µcal/s beträgt. Die schnellste Reaktionszeit, ohne dass eine Überkompensation auftritt, liegt bei 6 bis 7 Sekunden.

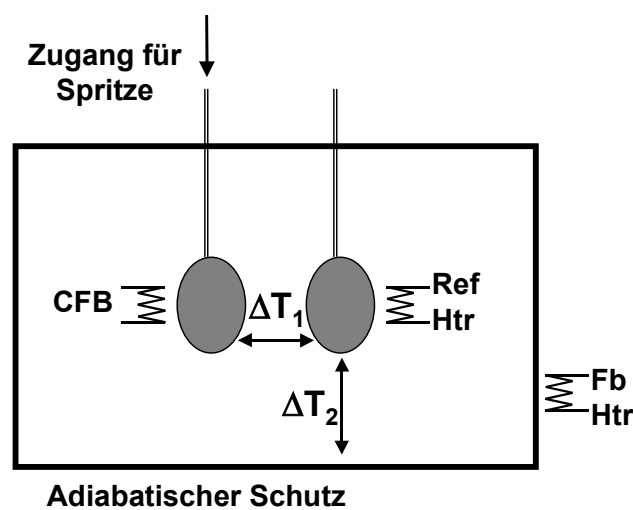


Abbildung 2.17. Schematische Darstellung des isothermen Titrationskalorimeters mit Messzelle (links) und Referenzzelle (rechts), die durch das Heizelement RefHtr („reference heater“) geheizt wird. ΔT_1 aktiviert das Heizelement CFB („cell feedback“), während ΔT_2 das Heizelement FbHtr („feedback heater“) aktiviert.

6.3.2 Energetische Betrachtung des Bindungsvorganges

Die reversible Bindung eines Liganden an ein Protein zu einem Protein-Ligand-Komplex wird im thermodynamischen Gleichgewicht durch das Massenwirkungsgesetz beschrieben.

Gleichung 6

$$K = \frac{[PL]}{[P][L]}$$

Dabei sind die Ausdrücke $[P]_{\text{tot}}$ und $[L]_{\text{tot}}$ wie folgt definiert:

Gleichung 7
$$[L]_{tot} = [L] + [PL]$$

Gleichung 8
$$[P]_{tot} = [PL] + [P] = [PL] + \frac{[PL]}{K \cdot [L]}$$

Aus diesen Gleichungen erkennt man, dass sich die Gesamtkonzentration des Liganden in der Messzelle aus der Summe der Konzentrationen des freien und des gebundenen Liganden zusammensetzt. Analog dazu setzt sich die Gesamtkonzentration an Protein aus der ungebundenen und der komplexierten Menge zusammen. Zusätzlich ist in Gleichung 8 die Konzentration des freien Proteins durch den Term, der sich nach Umstellung des Massenwirkungsgesetzes ergibt, ersetzt. Anschließend wird Gleichung 7 nach $[L]$ aufgelöst und in Gleichung 8 eingesetzt. Durch weitere mathematische Operationen erhält man folgende quadratische Gleichung:

Gleichung 9
$$[PL]^2 + [PL] \left(-[P]_{tot} - [L]_{tot} - \frac{1}{K} \right) + [P]_{tot} [L]_{tot} = 0$$

Die positive Wurzel dieser Gleichung lautet:

Gleichung 10
$$[PL] = \frac{-b - \sqrt{b^2 - 4a}}{2}$$

mit

Gleichung 11
$$b = -[P]_{tot} - [L]_{tot} - \frac{1}{K}$$

und

Gleichung 12
$$a = [P]_{tot} [L]_{tot}$$

Im nächsten Schritt wird die Konzentration des Protein-Ligand-Komplexes $[PL]$ nach der Gesamtkonzentration des Liganden $[L]_{tot}$ abgeleitet. Nach Umstellung der erhaltenen Gleichung ergibt sich:

Gleichung 13

$$\frac{d[PL]}{d[L]_{tot}} = \frac{1}{2} + \frac{1 - \frac{1+r}{2} - \frac{X_r}{2}}{\sqrt{X_r^2 - 2 X_r (1-r) + (1+r)^2}}$$

mit

Gleichung 14

$$r = \frac{1}{K [P]_{tot}}$$

und

Gleichung 15

$$X_r = \frac{[L]_{tot}}{[P]_{tot}}$$

Ziel der mathematischen Umformungen ist es, einen Zusammenhang zwischen der freigesetzten bzw. absorbierten Wärmemenge Q und den Konzentrationen in der Messzelle zu finden. Q hängt von folgenden Faktoren ab:

- a) Zellvolumen V
- b) molare Bindungsenthalpie ΔH
- c) Stöchiometrie
- d) Menge des eingespritzten Liganden
- e) Konzentrationen in der Messzelle

Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass mit der Abnahme an unkomplexiertem Protein die freigesetzte Wärmemenge verringert wird, ergibt sich die nachfolgende Gleichung. Dabei ist die Abnahme der Anzahl unbesetzter Bindetaschen antiproportional zur Konzentrationsänderung des Protein-Ligand-Komplexes $d[PL]$.

Gleichung 16

$$dQ = d[PL] \cdot \Delta H \cdot V$$

Der Term $d[PL]$ fasst dabei die Faktoren c), d) und e) zusammen, von denen die Wärmemenge Q abhängig ist.

Die Gleichung zeigt, dass die Änderung der Konzentration von [PL] der Änderung von Q proportional ist. Dies bedeutet, dass je größer die Änderung von [PL] ist, desto größer ist die umgesetzte Wärmemenge und umgekehrt.

Die Änderung der Konzentration von [PL] wurde bereits in Gleichung 13 beschrieben. Durch Substitution in Gleichung 16 erhält man:

$$\text{Gleichung 17} \quad \frac{1}{V} \cdot \frac{dQ}{d[L]_{tot}} = \Delta H \left\{ \frac{1}{2} + \frac{1 - \frac{1+r}{2} - \frac{X_r}{2}}{\sqrt{X_r^2 - 2 X_r (1-r) + (1+r)^2}} \right\}$$

Diese Beziehung beschreibt die Bindungsreaktion zwischen einem Protein und einem Liganden im Verhältnis 1:1 und ist ein Ausdruck für die umgesetzte Wärmemenge.

Bei einer starken Bindung zwischen Protein und Ligand, d.h. hohen K-Werten, werden bei jeder Zugabe die Ligandmoleküle sofort quantitativ gebunden. Die freigesetzte Wärmemenge bleibt gleich, da sie bei überschüssiger Enzymkonzentration nur von der Anzahl an eingespritzten Ligandmolekülen abhängt. Dieser Vorgang wiederholt sich bis zur kompletten Sättigung des Enzyms. Überschreitet man den Äquivalenzpunkt, so wird, da keine Bindungen mehr geknüpft werden, auch keine Wärme mehr freigesetzt. Der dennoch beobachtete Wärmeumsatz muss demnach auf andere Phänomene, wie z.B. Verdünnungseffekte zurückzuführen sein. Bei hohen K-Werten hat die Titrationskurve die Form einer Stufenfunktion, deren Höhe ΔH entspricht.

Bei kleineren Werten für K nimmt die freigesetzte Wärmemenge ab, sobald man sich dem Sättigungspunkt der Titration nähert. Dies kommt dadurch zustande, dass nicht mehr alle Ligandmoleküle quantitativ gebunden werden. Beim Übergang zu kleineren Werten für K geht also die Bindungskurve aufgrund der eben beschriebenen Phänomene in eine sigmoidale Form über. Bei zu kleinen K-Werten erhält man fast eine Horizontale. Aus solch flachen Kurven lassen sich keine Informationen über K mehr entnehmen.

Simulierte Bindungskurven bezüglich der Gleichung 17 sind in Abbildung 33 dargestellt. Für die Interpretation dieser Kurven wird ein zusätzlicher Parameter c eingeführt, der reziprok zum Wert r aus Gleichung 14 ist.

$$\text{Gleichung 18} \quad c = \frac{1}{r} = K[P]_{tot}$$

Bei einer sehr starken Bindung ($c = \infty$) des Liganden L an das Protein P werden alle Moleküle des Liganden sofort gebunden, bis die Sättigung des Proteins eintritt, d.h. bis alle katalytischen Zentren besetzt sind. Als Bindungskurve ergibt sich dann eine Stufenfunktion mit der Höhe ΔH .

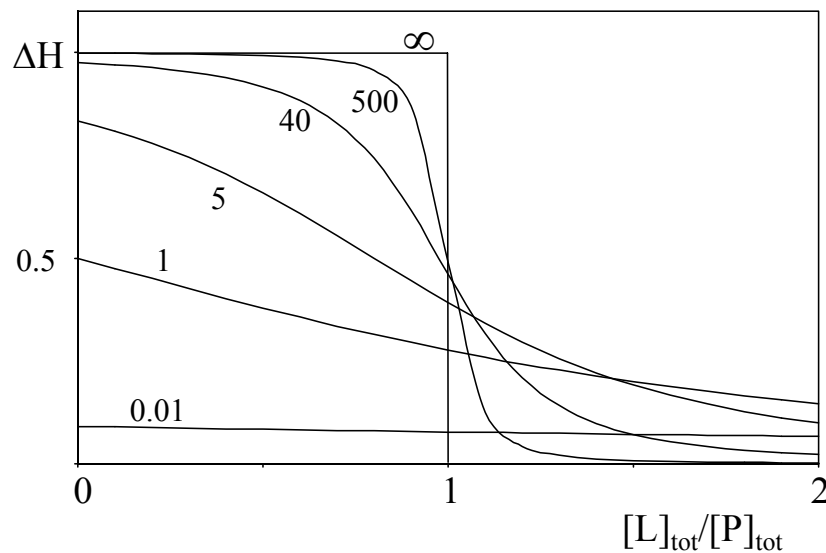


Abbildung 33. Simulierte Bindungsisotherme nach Gleichung 17 für verschiedene Parameter $c = K [P]_{\text{tot}}$. Die Werte für c sind in der Abbildung dargestellt.

Für relativ starke Ligandenbindungen mit $c = 10 - 500$ geht diese Stufenfunktion in eine sigmoidale Kurve über, deren Verlauf stark von dem Parameter c abhängt. Schwache Ligandenbindungen ergeben fast horizontale Bindungskurven ($c < 5$), die nur wenig Informationen über die Bindungskonstante K enthalten. Der c -Wert und die Bindungskonstante K sind direkt proportional zueinander. Große c -Werte sprechen daher für eine hohe Bindungskonstante, kleine c -Werte für eine niedrige.

Aus diesen Überlegungen ergibt sich zwangsläufig, dass bei großen Bindungskonstanten nur geringe Proteinkonzentrationen eingesetzt werden können, wenn man den oben genannten Bereich geeigneter c -Werte nicht verlassen möchte. Der Einsatz einer geringeren Proteinkonzentration führt aber im Gegenzug zu einer Verringerung der insgesamt freigesetzten Wärmemenge. Daher ist es unter Umständen möglich, dass bei einer solchen Messanordnung das Detektionslimit des Messgerätes unterschritten wird und dadurch eine Messung unmöglich wird.

6.3.3 Bestimmbare Größen

Die Messgrößen, die aus einer einzigen ITC-Messung erhalten werden können, sollen im folgenden Abschnitt kurz erläutert werden. Um diese Daten mittels einer anderen Methode zu bestimmen, sind mehrere Messungen unter unterschiedlichen Bedingungen erforderlich.

Das Messsignal der ITC ist, wie oben beschrieben, der Heizstrom zum Erwärmen der Messzelle, angegeben in $\mu\text{cal/s}$, aufgetragen gegen die Zeit. Es resultiert eine Kurve wie in Abbildung 34 (oben).

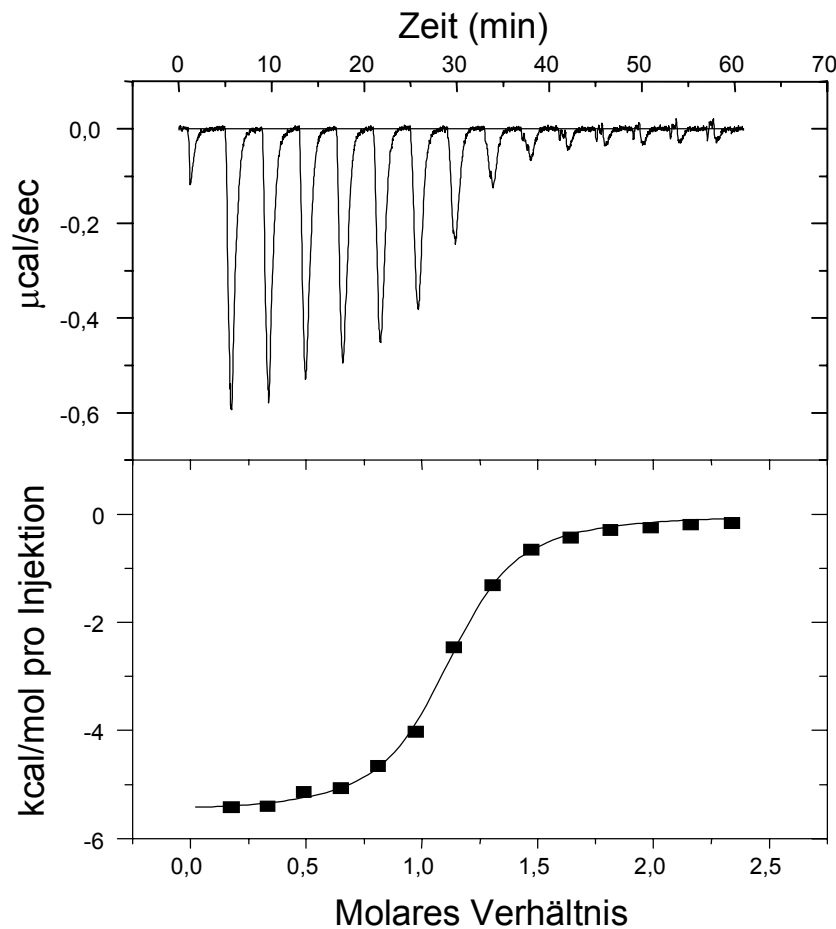


Abbildung 34. Ergebnis einer ITC-Messung. Die obere Hälfte zeigt die Rohdaten einer typischen ITC Messung. Jeder Peak steht für eine Injektion. Nach der vollständigen Sättigung des Proteins zeigen die letzten Peaks nur die Wärmetönung, die durch die Verdünnung des Liganden in der Zelle entsteht. Die Messpunkte in der unteren Hälfte der Abbildung sind jeweils das Integral der obigen Peaks. Die durchgezogene Kurve repräsentiert das Ergebnis der Kurvenanpassung nach der Methode der kleinsten Fehlerquadrate.

Anschließend wird mittels eines Computers das Integral der einzelnen Peaks zwischen Basislinie und Kurvenverlauf gebildet. Dieses wird dann gegen das molare Verhältnis von Ligand zu Protein aufgetragen, wie in Abbildung 34 (unten) dargestellt.

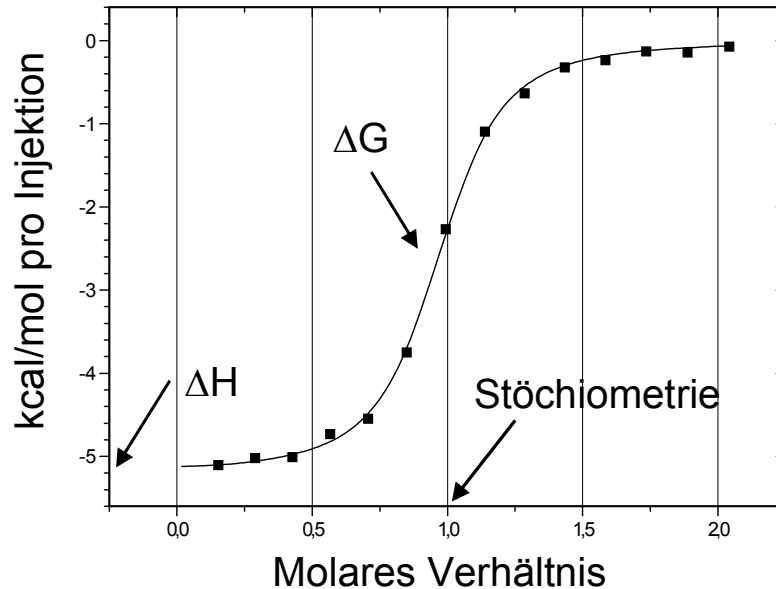


Abbildung 35. Auswertung einer ITC Messung. Die Messpunkte in der Abbildung entsprechen jeweils dem Integral der Messsignale. Die durchgezogene Kurve repräsentiert das Ergebnis der Kurvenanpassung nach der Methode der kleinsten Fehlerquadrate. Der Achsenabschnitt auf der Ordinate repräsentiert die Bindungsenthalpie ΔH , aus dem Kurvenverlauf lässt sich die Freie Bindungsenthalpie ΔG und somit auch die Bindungskonstante K bestimmen.

Den sigmoidalen Kurvenverlauf erhält man mittels einer mathematischen Fit-Funktion (Gleichung 17), mit deren Hilfe die Kurve an die erhaltenen Messpunkte angepasst wird. Die Berechnung der Kurve erfolgt vollautomatisch mit Hilfe eines PCs und einer entsprechenden Software. Aus dem Kurvenverlauf berechnet der PC den Wert der Bindungskonstante K , die Stöchiometrie der Reaktion und die Enthalpie ΔH . Die freie Enthalpie ΔG und die Entropie ΔS können anschließend daraus abgeleitet werden.

6.3.3.1 Enthalpie

Der Betrag der Enthalpie der untersuchten Bindungsreaktion lässt sich, wie in Abbildung 35 zu sehen, direkt aus dem Kurvenschnittpunkt mit der y-Achse ablesen. Dabei ist jedoch zu beachten, dass die durch ITC-Messungen bestimmte Enthalpie die gesamte Wärmetönung des kompletten Reaktionssystems darstellt. Sie enthält sowohl den Wärmeaustausch zwischen den reagierenden Molekülen, als auch die durch überlagerte Prozesse umgesetzte Wärmemenge. Dies können zum Beispiel konformative Änderungen, Ionisierung von polaren Gruppen und Wechselwirkungen mit den anderen Pufferkomponenten sein. Um die Enthalpie der reinen Bindungsreaktion zu bestimmen, müssen diese Wärmemengen zuvor abgezogen werden.

6.3.3.2 Bindungskonstante

Bei der ITC handelt es sich um eine Methode für thermodynamische Messungen. Solche Messungen machen keinerlei Aussagen über die Kinetik einer Reaktion, sondern liefern lediglich Daten über energetische Änderungen der Reaktionspartner. Registriert wird also lediglich die Aufnahme bzw. Abgabe von Wärme. Um zu auswertbaren Ergebnissen zu kommen, ist es notwendig, dass bei Konzentrationen gearbeitet wird, bei denen ausreichende Mengen an Ligand, freiem Protein und Komplex vorhanden sind. Die verwendeten Konzentrationen müssen oberhalb der Dissoziationskonstanten des Komplexes liegen. Nur dann kann die resultierende sigmoidale Kurve ausgewertet werden. Zu hohe Konzentrationen resultieren in einem zu hohen c-Wert mit den weiter oben beschriebenen Folgen. Zu niedrige Konzentrationen entsprechen einem zu niedrigen c-Wert, was auch zu einem nicht auswertbaren Kurvenverlauf bezüglich der Bindungskonstanten führt.

6.3.3.3 Freie Enthalpie und Entropie

Da die Messung isotherm erfolgt, lässt sich unter Standardbedingungen nach der Bestimmung der Reaktionsenthalpie und der Bindungskonstanten auch die Änderung der freien Enthalpie und in der Folge die Entropieänderung mit Gleichung 19 berechnen:

Gleichung 19
$$\Delta G = -R \cdot T \cdot \ln K = \Delta H - T \cdot \Delta S$$

Auch hier ist zu beachten, dass sich die gemessene Entropieänderung aus den Beiträgen des gesamten Systems zusammensetzt.

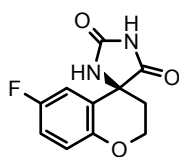
6.3.3.4 Stöchiometrie der Reaktion

Aus einer mittels einer ITC-Titration erhaltenen sigmoidalen Kurve lässt sich die Stöchiometrie der beobachteten Reaktion direkt ablesen. Voraussetzung hierfür ist, dass mit Konzentrationen oberhalb der Dissoziationskonstanten gearbeitet wird. Nur in diesem Fall ist der zur Bestimmung des Äquivalenzpunktes benötigte Sprung in der Titrationskurve deutlich zu sehen.

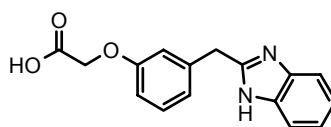
6.3.4 Durchführung der Messungen

Damit die entstehende Reaktionswärme nicht von anderen wesentlich stärkeren Effekten wie Verdünnungswärme oder anderen Mischungseffekten überlagert wird, müssen Enzym und Ligand in Pufferlösungen gelöst werden, die sich bezüglich pH-Wert, Zusammensetzung und Konzentration nicht unterscheiden. Vor dem Befüllen von Zelle und Spritze müssen beide Lösungen erst durch das Anlegen eines Unterdrucks entgast werden, um die Wärmekapazität der Messzelle nicht zu verfälschen. Anschließend muss beim Befüllen darauf geachtet werden, keine Luftblasen in Zelle oder Spritze zu bekommen. Nach dem Starten der Messung dauert es ca. 10 Minuten bis das Gerät die Lösungen in der Zelle vollständig thermostatisiert hat. Die eigentliche Messung besteht aus 10 bis 20 Einspritzungen eines Aliquots von 10 - 20 μl Volumen. Die Wartezeit zwischen zwei Einspritzungen hängt im Wesentlichen davon ab, wie lange das System braucht, um nach einem Messpeak wieder eine stabile Basislinie herzustellen, d.h. die Temperaturdifferenz zwischen Mess- und Referenzzelle auszugleichen. In der Regel liegt dieser Zeitraum zwischen zwei und fünf Minuten. Das verwendete Volumen einer Einspritzung hängt von einigen unterschiedlichen Faktoren ab, wie z.B. Inhibitor- und Proteinkonzentration, Größe der Spritze, erwarteter Wärmetönung und Bindungskonstante K . Die Konzentration des Liganden in der Messzelle am Ende der Messung sollte etwa doppelt so groß sein wie die eingesetzte Proteinkonzentration. Bei einer solchen Wahl der Konzentrationen kommen die letzten Signale, die ja beträchtlich hinter dem Äquivalenzpunkt liegen nur noch aufgrund von Verdünnungswärme des Liganden oder unspezifischen Bindungsvorgängen zustande, da das Protein zu diesem Zeitpunkt bereits vollständig gesättigt ist. Diese daraus resultierende Wärme muss daher von der eigentlichen Bindungsisothermen subtrahiert werden.

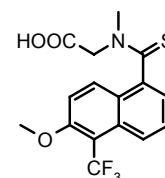
6.3.4.1 Inhibitor Datensatz



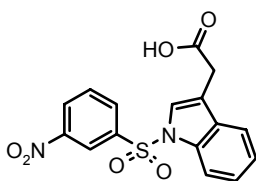
Sorbinil



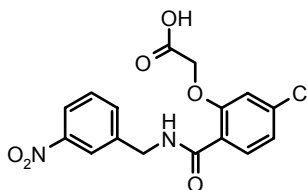
HD04



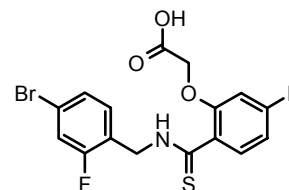
Tolrestat



IDD370



IDD393



IDD594

6.3.4.2 Kalibrierung

Das Kalorimeter wurde halbjährlich kalibriert. Die Kalibrierung erfolgt mittels einer Reihe elektrischer Standardimpulse. Die beiden Zellen sind dabei mit Wasser zu füllen. Aus dem Verhältnis von gemessener Wärmemenge zu theoretisch zu erwartender Wärmemenge wird über alle Wärmeimpulse ein Mittelwert gebildet, der zur Anpassung der Kalibrierungskonstanten dient. Dabei wird die neue Kalibrierungskonstante const' gemäß Gleichung 20 durch Multiplikation der alten Konstante const mit diesem durchschnittlichen Verhältnis von erwarteter zu gemessener Wärmemenge erhalten.

Gleichung 20
$$\text{const}' = \text{const} \cdot [\Sigma(W_{\text{erwartet}} / W_{\text{gemessen}}) / \text{Anzahl Impulse}]$$

Dies ist allerdings nur notwendig, falls die gemessenen Wärmemengen um mehr als 1% von den erwarteten Wärmemengen abweichen, was nie der Fall war.

6.3.4.3 Allgemeine Messvorschrift

Alle Messungen wurden bei 25 °C durchgeführt. Dazu wurde der Thermostat des Kalorimeters ebenfalls auf 25 °C eingestellt. Alle Messungen wurden bei pH 8,0 in 10 mM TRIS- oder HEPES-Puffer durchgeführt, der keine weiteren Zusätze (insbesondere keine Salze) enthielt.

Zur Katalyse der Reduktion von Aldehyden benötigt Aldose Reduktase den Kofaktor NADPH, es handelt sich also um ein ternäres System. Da nur die bei der Bindung des Liganden an das Holo-Enzym (den Protein-Kofaktor-Komplex) auftretende Wärmetönung gemessen werden sollte, wurde das Enzym mit dem Kofaktor präinkubiert. Der Kofaktor NADP^+ bzw. NADPH wurde in 10fachem Überschuss (bezogen auf das Enzym) zusammen mit dem Enzym in der Messzelle vorgelegt. Die Lösung wurde unter Rühren entgast und dann blasenfrei mit einer Hamiltonspritze in die Messzelle eingefüllt, die vorher mit Wasser vorgespült worden war.

Der zu messende Ligand wurde in demselben Puffer wie das Protein gelöst. Diese Lösung enthielt den Kofaktor in der gleichen Konzentration wie in der Messzelle. Die Konzentration des Liganden in der Spritze war in der Regel zehnmal so groß wie die Konzentration des Proteins in der Messzelle. Die Lösung wurde ebenfalls unter Rühren entgast. Die Spezialspritze für die kalorimetrische Messung wurde blasenfrei mit der Lösung des Liganden aufgezogen. Bei allen Messungen wurde eine 250 μl Spritze verwendet. Die Injektionsvolumina lagen zwischen 10 und 15 μl in Abhängigkeit von der Größe der gemessenen Wärmetönung. Als Injektionszeit wurde jeweils die Hälfte des von der MicroCal Observer Software vorgegebenen Wertes gewählt. Es wurden 15 – 20 Injektionen durchgeführt. Die Wartezeit zwischen zwei Injektionen betrug in der Regel 400 Sekunden und die Rührgeschwindigkeit 400 Umdrehungen pro Minute. Die Wartezeit vor der ersten Injektion (*initial delay*) lag bei 180 Sekunden. Die Referenz-Heizleistung (*reference offset*) konnte bei allen Messungen auf 10 % gesetzt werden.

Tabelle 26. Typische Zusammensetzung der Lösungen in der Messzelle und in der Spezialspritze. (Konzentration der Stammlösung)

Messzelle	Spritze
1800 μl hAR-Stammlösung (28 μM)	1800 μl Ligand-Stammlösung (280 μM)
200 μl Kofaktor-Stammlösung (2,5 mM)	200 μl Kofaktor-Stammlösung (2,5 mM)

Zur Auswertung der Messdaten wurde die mitgelieferte Software Microcal Origin Version 5.0 und spezielle Auswertungsskripte verwendet. Die Anpassung der Bindungsisothermen an die Messpunkte erfolgte nach der Methode der kleinsten Fehlerquadrate (*least squares fit*). Für die Stöchiometrie der Bindungsreaktion wurde häufig ein Wert $n < 1$ erhalten. Da dieser Wert theoretisch bei eins liegen muss, wurde dies auf eine Verringerung der Konzentration des

aktiven Proteins zurückgeführt. Es war offensichtlich, dass das Protein „altert“, da die Abweichung von dem theoretischen Wert im Laufe der Zeit zunahm. Um nur die Konzentration des aktiven Proteins zu berücksichtigen, wurde die Proteinkonzentration bei der Auswertung so angepasst, dass ein stöchiometrischer Faktor $n \approx 1$ erhalten wurde.

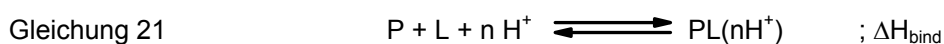
Aus der Anpassung der Bindungsisothermen an die Messpunkte ergibt sich der Fehler mit dem jede einzelne Messung versehen ist. Zur Bestimmung eines statischen Fehlers wurden die Messungen bis zu viermal wiederholt. Allerdings konnten aufgrund des Mangels an Proteinmaterial nicht alle Messungen hinreichend oft wiederholt werden, um einen verlässlichen statistischen Mittelwert und Fehler zu bestimmen.

Die Verdünnungswärme des Inhibitors wurde durch Injektion der Inhibitorlösung (ohne Kofaktor) in die Messzelle, in der die Pufferlösung (ohne Protein) vorgelegt war, ermittelt. Analog wurde die Verdünnungswärme des Proteins durch Injektion der Pufferlösung in die Messzelle, in der das Protein (im gleichen Puffer gelöst) vorgelegt war, gemessen. Die Wärmemenge, die durch die Verdünnung des Inhibitors oder des Proteins entsteht, lag aufgrund der geringen Konzentrationen in der Regel unterhalb des Detektionslimits. Daher brauchte keine Korrektur bezüglich der Verdünnungswärmen zu erfolgen.

6.3.4.4 Ionisierungsreaktionen

Kalorimetrische Untersuchungen von biologischen Systemen werden in gepufferten Lösungen durchgeführt, um den pH-Wert konstant zu halten. Werden gleichzeitig mit der eigentlichen Bindungsreaktion Protonen vom beobachteten System aufgenommen oder abgegeben, so ist die Enthalpie, die auf diese Protonierungsreaktion zurückzuführen ist, ein Teil der gemessenen Gesamtenthalpie. Die Reaktion der Protonierung läuft folglich simultan zur Assoziationsreaktion zwischen Ligand und Protein ab.

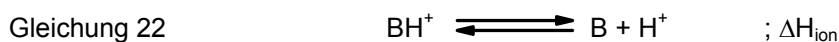
Als Beispiel wird eine Reaktion zwischen einem Protein P und dem Liganden L betrachtet:



Das Protein P bildet mit dem Liganden L den Komplex PL. Falls sich der Protonierungszustand bei dieser Assoziationsreaktion ändert, können vom System entweder n Protonen aufgenommen ($n > 0$) oder n Protonen abgegeben ($n < 0$) werden. Der Wert ΔH_{bind} beschreibt

die intrinsische Bindungsenthalpie unter der Annahme, dass die ionisierbare funktionelle Gruppe von P bzw. L keine von Null verschiedene Ionisierungsenthalpie aufweist.

Wenn diese Reaktion in einer gepufferten Lösung stattfindet, so werden von der Puffersubstanz BH^+ Protonen aufgenommen oder abgegeben.



Das heißt also, dass die Protonen, die vom System aufgenommen werden, von der Puffersubstanz abgegeben werden und umgekehrt.

Wenn man die intrinsische Bindungsenthalpie ΔH_{bind} der Protein-Liganden-Bindung und die Enthalpie ΔH_{ion} , die mit der Protonenaufnahme oder –abgabe des Puffers zusammenhängt, betrachtet, so ist die kalorimetrisch gemessene Wärmetönung ΔH_{ges} die Summe dieser beiden Enthalpien.

Gleichung 23
$$\Delta H_{ges} = \Delta H_{bind} + n \Delta H_{ion}$$

Das bedeutet, dass für die richtige Bestimmung der intrinsischen Bindungsenthalpie ΔH_{bind} der Beitrag des Puffers von der gemessenen Wärmetönung ΔH_{ges} abgezogen werden muss.

Um aber den richtigen Beitrag des Puffers für die Bestimmung der intrinsischen Enthalpie ΔH_{bind} zu ermitteln, muss man die betreffende Ionisierungsenthalpie ΔH_{ion} des Puffers und die Anzahl n der übertragenen Protonen kennen.

In dieser Arbeit wurden die kalorimetrischen Messungen des hAR-Ligand-Systems bei konstantem pH-Wert und konstanter Temperatur in zwei verschiedenen Puffern wiederholt, die sich in ihren Ionisierungsenthalpien signifikant unterscheiden. HEPES hat mit 21,07 kJ/mol eine viel kleinere Ionisierungsenthalpie als TRIS mit 48,07 kJ/mol (Fukada and Takahashi 1998). Ansonsten war die Zusammensetzung völlig identisch, um vergleichbare Ergebnisse zu erhalten. Durch Auftragen der gemessenen Wärmetönungen ΔH_{ges} gegen die jeweiligen Ionisierungsenthalpien ΔH_{ion} der Puffersubstanzen wurde der Achsenabschnitt auf der ΔH_{ges} -Achse und somit die intrinsische Enthalpie ΔH_{bind} des betrachteten Systems bestimmt. Aus der Steigung der Geraden wurde der Parameter n bestimmt, der für die Anzahl der übertragenen Protonen steht.

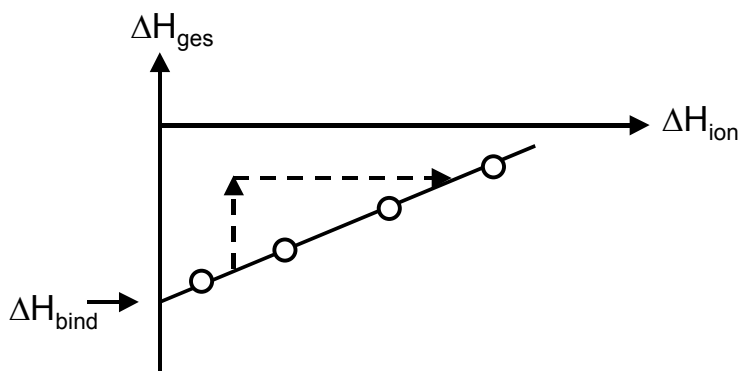


Abbildung 36. Gemessene Enthalpie ΔH_{ges} aufgetragen gegen die jeweilige Ionisierungsenthalpie ΔH_{ion} . Die Steigung der angepassten Geraden ergibt die Anzahl n der übertragenen Protonen. Der Abschnitt auf der ΔH_{ges} -Achse bestimmt die intrinsische Bindungsenthalpie ΔH_{bind} .

Besitzt die ionisierbare funktionelle Gruppe des Liganden bzw. des Proteins eine von Null verschiedene Ionisierungsenthalpie, muss zusätzlich noch ein Korrekturterm für die Ionisierungsenthalpie dieser Gruppe berücksichtigt werden. Für die Korrektur der gemessenen Enthalpie um den Wärmebeitrag, der durch die Deprotonierung der Hydantoin-Gruppe des Sorbinil entstand, wurde die Ionisierungsenthalpie von Hydantoin bestimmt. Dazu wurde eine 50 mM Hydantoin-Lösung auf pH 9,16 eingestellt, entsprechend dem pK_{A} -Wert der Verbindung (Edward et al. 1957; Zief et al. 1937). Die Lösung wurde entgast und in der Messzelle des ITC-Gerätes vorgelegt. Anschließend wurden mit der 100 μl Spritze 10 Aliquote je 10 μl Volumen einer 1 mM Salzsäure injiziert. Aus den bei 25 °C gemessenen Enthalpien je Injektion bildete man den Mittelwert. Zur Bestimmung der Verdünnungsenthalpie injizierte man die 1 mM Salzsäure nach dem gleichen Protokoll in eine mit Wasser gefüllte Zelle. Die gemessene Ionisierungsenthalpie wurde danach um den Betrag der Verdünnungsenthalpie korrigiert.

6.4 Methoden des computergestützten Wirkstoff-Designs

Für die *Molecular Modeling* Arbeiten wurden die Programmpakete SYBYL 6.7 und 6.8 (2001a) sowie MOLOC 01/05/08 (Gerber 2001) verwendet. Als Workstation diente eine Silicon Graphics O2 (R5000).

6.4.1 Berechnung von günstigen Wechselwirkungsfeldern in der Bindetasche

Günstige Wechselwirkungsfelder (*Hot Spots*) in der Bindetasche wurden mit den Programmen SUPERSTAR (BOER, KROON ET AL. 2001; VERDONK, COLE ET AL. 1999; VERDONK, COLE ET AL. 2001) und DRUGSCORE (Gohlke, Hendlich et al. 2000a; Gohlke, Hendlich et al. 2000b) berechnet. Beide Ansätze haben gemeinsam, dass zunächst ein dreidimensionales Gitter in die Protein-Bindetasche platziert wird. An jedem Gitterpunkt werden dann die Wechselwirkungen einer bestimmten Sonde zu den umgebenden Proteinatomen berechnet.

6.4.1.1 Berechnungen mit SuperStar

SUPERSTAR basiert auf Informationen über nicht bindende Wechselwirkungen, die aus einer statistischen Analyse von Packungsmustern in Kristallstrukturen von kleinen Molekülen abgeleitet wurden (Verdonk, Cole et al. 1999). Als Datenbasis dient die ISOSTAR-Datenbank (Bruno et al. 1997). In dieser Datenbank sind Informationen über Wechselwirkungen als Streuungs-Diagramme (*scatterplots*) gespeichert. Diese *scatterplots* zeigen die Verteilung einer bestimmten Kontaktgruppe, die als Sonde fungiert, um ein zentrales Strukturfragment. SUPERSTAR zerlegt ein Templatmolekül (z.B. eine Bindetasche) in eine Reihe von solchen Strukturfragmenten, für die eine ausreichende Anzahl von Einträgen in der IsoStar-Datenbank vorhanden sind. Die zu den Fragmenten gehörenden *scatterplots* werden auf die entsprechenden Teile des Templats überlagert und in eine Wahrscheinlichkeitsdichte konvertiert. Diese kann auf verschiedenen Wahrscheinlichkeitsniveaus konturiert werden. Ein Wahrscheinlichkeitsniveau von 2,0 bedeutet, dass die Kontakte auf einem bestimmten Gitterpunkt mit einer zweimal höheren Wahrscheinlichkeit auftreten, als dies bei einer zufälligen Verteilung zu erwarten wäre.

Als Repräsentant für einen Wasserstoffbrücken-Akzeptor wurde die neutrale Carbonyl-Sauerstoff-Sonde gewählt. Hydrophobe Wechselwirkungen wurden mit der aromatischen Kohlenstoff-Sonde sowie mit der Methyl-Kohlenstoff-Sonde charakterisiert. Die Berechnungen wurden mit den Standardeinstellungen durchgeführt. Als Templatmolekül

wurde die Kristallstruktur der humanen Aldose Reduktase im Komplex mit dem Inhibitor IDD594 verwendet. Zur graphischen Auswertung wurden die *Hot Spots* so konturiert, dass relativ scharf lokalisierte Felder erhalten wurden.

6.4.1.2 Berechnungen mit DRUGSCORE

DRUGSCORE basiert auf Daten, die aus Kristallstrukturen von Ligand-Protein-Komplexen abgeleitet wurden (Gohlke, Hendlich et al. 2000a; Gohlke, Hendlich et al. 2000b). Als Datenbasis diente die RELIBASE-Datenbank (Hendlich 1998; Hendlich, Bergner et al. 2003). Die Häufigkeit des Auftretens bestimmter Protein-Ligand-Kontakte wurde dabei in Bezug auf einen Referenzzustand in Pseudo-Potenziale konvertiert. Die Auflösung von Protein-Kristallstrukturen ist in der Regel zu gering, um Wasserstoffatome zuordnen zu können. Deshalb wurden bei der Ableitung der DRUGSCORE-Potenziale Wasserstoffatome im Gegensatz zu SUPERSTAR nicht explizit berücksichtigt. Die Potenziale können sowohl zum Bewerten von Ligand-Protein-Wechselwirkungen (als Scoring-Funktion), als auch zur Vorhersage von ausgezeichneten Wechselwirkungsbereichen in der Bindetasche verwendet werden. Bei der Berechnung von *Hot Spots* wird der niedrigste Potenzial-Wert, der auf einem Gitterpunkt berechnet wird (das globale Optimum), von DRUGSCORE auf 100 gesetzt. Ein Niveau von 80 bedeutet, dass der Bereich Funktionswerte von bis zu 20% über dem globalen Optimum für den betrachteten Atomtyp umschließt. Als Repräsentant für einen Wasserstoffbrücken-Akzeptor wurde die O.2-Sonde gewählt. Hydrophobe Wechselwirkungen wurden mit der C.ar- sowie mit der C.3-Sonde charakterisiert. Die Berechnungen wurden mit den Standard-Einstellungen durchgeführt. Verwendet wurde die Kristallstruktur der humanen Aldose Reduktase im Komplex mit dem Inhibitor IDD594. Zur graphischen Auswertung wurden die *Hot Spots* so konturiert, dass relativ scharf lokalisierte Felder erhalten wurden.

6.4.2 Generierung von Datenbanken für das virtuelle Screening

In den verwendeten Datenbanken sind die Moleküle zumeist als 2D-Strukturen gespeichert. Mit CORINA (Sadowski 1997) wurden daraus 3D-Strukturen generiert. Dabei wurden fehlende Wasserstoffatome (z. B. von Carboxylatgruppen) ergänzt und kleine Fragmente, die nicht kovalent mit einem zweiten Molekül verbunden waren (z. B. Gegenionen), entfernt. Anschließend wurden aus den so generierten 3D-Strukturen mit Hilfe des UNITY-Befehls **dbimport** UNITY-Datenbanken erzeugt (2001b). Mit dem Befehl **dbmkscreen** wurden *Macro-Fingerprints* generiert, um spätere Suchen zu beschleunigen.

Folgende Datenbanken wurden verwendet:

- Available Chemicals Directory ACD (Version 2000.1), <http://www.mdli.com>
- Maybridge (Version 6/2000), <http://www.maybridge.com>

6.4.3 UNITY-Pharmakophor-Generierung

Pharmakophor-Modelle wurden mit UNITY (2001B) aufgebaut. Die geforderten Wechselwirkungseigenschaften (Wasserstoffbrücken-Donor bzw. -Akzeptor, hydrophobe Gruppe) wurden durch Pseudozentren im Raum beschrieben. Die Positionierung dieser Pseudozentren erfolgte entweder anhand von günstigen Wechselwirkungsfeldern (*Hot Spots*) oder durch Vergleich der physikochemischen Eigenschaften überlagerter AR-Inhibitoren. Suchtoleranzen wurden durch Sphären um diese Punkte festgelegt, wobei der Radius der maximalen Abweichung entsprach. Bei der in Kapitel 4.2 beschriebenen Datenbanksuche wurden die Radien der Suchtoleranzen auf Ligand-Seite den zu Grunde liegenden *Hot Spots* angepasst.

Bei der in Kapitel 4.3 beschriebenen Datenbanksuche wurde die Form der Bindetasche durch die Festlegung von verbotenen Bereichen (*excluded volumes*) in den Pharmakophor einbezogen. Die Radien der verbotenen Bereiche auf Proteinseite wurden so eingestellt, dass Liganden in einem Testdatensatz, bestehend aus bereits bekannten AR-Inhibitoren der Pharmakophorhypothese genügten.

6.4.4 Proteinüberlagerung

Die Kristallstruktur der humanen Aldose Reduktase im Komplex mit dem Inhibitor IDD594 wurde in eine interne Version der RELIBASE+ Datenbank aufgenommen und diente als Referenz für die Überlagerung der restlichen in PDB abgelegten Proteinstrukturen der Aldose Reduktase. Die Sequenzidentität zwischen humaner und AR aus Schweinelinsen liegt bei 86,3%. Daher wurden alle Strukturen mit einer Sequenzidentität $\geq 85\%$ gesucht. Die Strukturen wurden mit RELIBASE+ auf die Referenz überlagert und im mol2-Format exportiert. Bei Hendlich et al. finden sich weitere Angaben zum verwendeten Algorithmus. Da in den exportierten Dateien Informationen über Bindungen fehlten, wurden die Original-PDB-Koordinaten mit dem SYBYL-Kommando *fit* (nur die C ^{α} Atome wurden verwendet) auf die von RELIBASE+ generierten Koordinaten gelegt.

6.4.5 Molekülüberlagerung und Ähnlichkeitsvergleich

Für die Überlagerung kleiner Moleküle wurde das ursprünglich von Kearsley und Smith entwickelte, später von Klebe et al. modifizierte Programm SEAL (**S**teric and **E**lectrostatic **A**lignment) verwendet (Klebe, Mietzner et al. 1994). Das Programm überlagert Moleküle anhand ihrer physikochemischen Eigenschaften. Diese werden über van-der-Waals-Radien, Partialladungen, atombasierende Hydrophobizitäten (Viswanadhan et al. 1989) und Wasserstoffbrücken-Eigenschaften ausgedrückt. Das Ähnlichkeitsmaß zweier rigider Moleküle bei der Überlagerung wird durch eine Bewertungsfunktion ermittelt, die formal dem von Carbó definierten Ähnlichkeitsmaß entspricht. Der räumliche Verlauf der Eigenschaften bei der Berechnung der Bewertungsfunktion wird über Gauss-Funktionen dargestellt. Die Überlagerung erfolgt dadurch, dass die Bewertungsfunktion durch Translation und Rotation eines Moleküls maximiert wird.

Die Prozedur *align* kombiniert SEAL mit dem Programm MIMUMBA, das eine wissensbasierte Konformationsanalyse der Moleküle ermöglicht. Dies erlaubt die flexible Überlagerung der Verbindungen aus dem Testdatensatz bzw. aus der Datenbanksuche auf eine rigide Referenzstruktur. Eine genaue Beschreibung des Algorithmus findet sich bei (Krämer 1999).

Als Referenzstruktur wurden die mit dem SYBYL-Befehl *merge* (unter Beibehaltung aller Atome) vereinigten Inhibitoren Sorbinil, Tolrestat und Zopolrestat verwendet. Die Bindungsgeometrien der drei Inhibitoren wurden den mit RELIBASE+ überlagerten Komplexstrukturen entnommen (PDB-Codes 1ah0, 1ah0, 1mar).

Partialladungen wurden für alle Verbindungen nach der Methode von Gasteiger und Marsili berechnet.

Jede Verbindung des Testdatensatzes bzw. aus der Datenbanksuche wurde einzeln auf die Referenz überlagert, wobei für jede Verbindung 50 Konformationen mit MIMUMBA generiert wurden und bis zu zehn Überlagerungs-Lösungen berechnet wurden.

6.4.6 Docking-Verfahren

Als Docking-Programm wurde FLEXX (Rarey, Kramer et al. 1996a) (Version 1.10.0) benutzt. Der Docking-Algorithmus von FLEXX beruht auf einer Strategie zum schrittweisen Aufbau des Liganden in der Bindetasche. Diese Strategie besteht im wesentlichen aus drei Phasen:

1. **Auswahl eines Basisfragmentes.** Ein Teil des Liganden wird als Basisfragment ausgewählt.
2. **Basisfragment-Platzierung.** Das Basisfragment wird unabhängig vom Rest des Liganden in der Bindetasche platziert.
3. **Aufbau des Protein-Ligand-Komplexes.** Ausgehend von den verschiedenen Platzierungen des Basisfragmentes wird der Ligand schrittweise durch Anfügen der verbleibenden Fragmente des Liganden in der Bindetasche aufgebaut.

Um die Verbindungen (aus der Datenbanksuche) für das Docking vorzubereiten, wurden zunächst die Protonierungszustände mit einem Shell-Skript angepasst. Carbonsäure- und isostere Gruppen wurden deprotoniert. Formalladungen wurden von FLEXX zugewiesen.

Als Referenz wurde die hochaufgelöste Komplexstruktur der humanen Aldose Reduktase mit dem Inhibitor IDD594 (noch kein PDB-Eintrag) verwendet. FLEXX verwendet Templatstrukturen für die verschiedenen Aminosäuren, Histidin110 wurde das seinem tautomeren Zustand entsprechende Templat zugewiesen. Der Diederwinkel der Tyr48 OH-Gruppe wurde der Kristallstruktur entsprechend angepasst. Der Kofaktor NADP⁺ wurde als *hetero file* eingebunden.

Während der Komplexbildungsphase wurde die modifizierte Böhm-Funktion zur Bewertung der Platzierungen benutzt. Die Docking-Lösungen wurden anschließend mit der in FLEXX implementierten Version von DRUGSCORE nachbewertet. Anschließend wurden die Lösungen mit einem PERL-Skript gefiltert, um die Lösung mit der besten Bewertung zu finden. Mit UNITY wurde überprüft, ob diese Lösung gleichzeitig der Pharmakophorhypothese entspricht. Nur diese Verbindungen wurden im weiteren Vorgehen berücksichtigt.

6.4.6.1 FLEXE

Die FLEXX-Version 1.11.2 beinhaltet FLEXE (Claussen, Buning et al. 2001) als zusätzliches Modul zum *Docking* von Liganden in ein Ensemble von Proteinstrukturen. FLEXE vereinigt

ähnliche Teile der Proteinstrukturen, während Teile, die unterschiedliche Konformationen zeigen, als Alternativen behandelt werden.

Das Ensemble wurde durch die Komplexstrukturen der Aldose Reduktase mit den Inhibitoren Sorbinil (PDB-Code 1ah0), Tolrestat (PDB-Code 1ah3) und IDD594 (noch kein PDB-Eintrag) definiert. Die Strukturen waren zuvor mit RELIBASE+ überlagert worden.

6.4.7 Hierarchische Datenbanksuchen

Die in Kapitel 4.2 und 4.3 beschriebenen virtuellen Screening-Läufe wurden nach einem hierarchischen Protokoll durchgeführt, wobei die einzelnen Schritte in ihrer Komplexität und damit in der benötigten Rechenintensität zunahmen. Die genaue Abfolge der Filterschritte ist in den jeweiligen Kapiteln angegeben.

Um das zulässige Molekulargewicht und die Anzahl drehbarer Bindungen einzuschränken, wurde das SYBYL-Modul SELECTOR verwendet (Funktion: *compound filtering*). 2D-Topologie-Suchen und flexible 3D-Suchen wurden mit UNITY (2001b) durchgeführt. Für die flexible 3D-Suche wird die sog. *directed tweak*-Methode angewendet (Hurst 1994). In diesem Schritt wurden die generierten Pharmakophorhypothesen verwendet. Gemäß den Standardeinstellungen von UNITY wurde die Erfüllung der *rule-of-five* (Lipinski, Lombardo et al. 1997) überprüft, obwohl das primäre Ziel die Suche nach neuen Leitstrukturkandidaten war, die in der Regel kleiner sind als Arzneistoffe (Hann et al. 2001; Oprea, Davis et al. 2001) und dementsprechend auch weniger Donor- bzw. Akzeptorgruppen besitzen.

Als ein weiterer (bewertender) Filterschritt folgte entweder das Einpassen der Kandidatenmoleküle in die Bindetasche der Aldose Reduktase mit FLEXX oder die Überlagerung der Verbindungen auf eine Referenz aus bereits bekannten Inhibitoren mit SEAL.

Am Ende der Datenbanksuche stand jeweils die visuelle Inspektion der verbliebenen Kandidatenmoleküle. Darauf wurde auf folgende Kriterien geachtet:

- Übereinstimmung mit dem als essentiell angenommenen Wasserstoffbrücken-Netzwerk
- Komplementarität von Ligand- und Proteinoberfläche
- Fehlen von ungünstigen oder repulsiven Wechselwirkungen
- Besetzung einer Spezifitätstasche

7 Literaturverzeichnis

Available Chemicals Directory ACD 00.1 (2000). MDL Information Systems, Inc., San Leandro (CA).

SYBYL Molecular Modelling Package 6.8 (2001a). Tripos Inc., St. Louis (MO).

UNITY Chemical Information Software 4.3 (2001b). Tripos Inc., St. Louis (MO).

Amos, A. F.; McCarty, D. J. and Zimmet, P. (1997). *The rising global burden of diabetes and its complications: estimates and projections to the year 2010*. Diabet. Med. **14**(Suppl 5), S1-85.

Andrews, P. R.; Craik, D. J. and Martin, J. L. (1984). *Functional group contributions to drug-receptor interactions*. J. Med. Chem. **27**(12), 1648-57.

Bajorath, J. (2002). *Integration of virtual and high-throughput screening*. Nature Rev. Drug Discov. **1**(11), 882-94.

Bayly, C. I.; Cieplak, P.; Cornell, W. et al. (1993). *A well-behaved electrostatic potential based method using charge restraints for deriving atomic charges: the RESP model*. J. Phys. Chem. **97**(40), 10269-10280.

Berendsen, H. J. C.; Postma, J. P. M.; vanGunsteren, W. F. et al. (1984). *Molecular dynamics with coupling to an external bath*. J. Chem. Phys. **81**, 3684-3690.

Bergner, A.; Gunther, J.; Hendlich, M. et al. (2001). *Use of Relibase for retrieving complex three-dimensional interaction patterns including crystallographic packing effects*. Biopolymers **61**(2), 99-110.

Berman, H. M.; Battistuz, T.; Bhat, T. N. et al. (2002). *The Protein Data Bank*. Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr. **58**(Pt 6 No 1), 899-907.

Bernstein, F. C.; Koetzle, T. F.; Williams, G. J. et al. (1977). *The Protein Data Bank: a computer-based archival file for macromolecular structures*. J. Mol. Biol. **112**(3), 535-42.

- Bissantz, C.; Folkers, G. and Rognan, D. (2000). *Protein-based virtual screening of chemical databases. 1. Evaluation of different docking/scoring combinations*. J. Med. Chem. **43**(25), 4759-67.
- Boer, D. R.; Kroon, J.; Cole, J. C. et al. (2001). *SuperStar: comparison of CSD and PDB-based interaction fields as a basis for the prediction of protein-ligand interactions*. J. Mol. Biol. **312**(1), 275-87.
- Böhm, H. J. (1992). *The computer program LUDI: a new method for the de novo design of enzyme inhibitors*. J. Comput.-Aided Mol. Des. **6**(1), 61-78.
- Böhm, H. J. and Stahl, M. (2000). *Structure-based library design: molecular modelling merges with combinatorial chemistry*. Curr. Opin. Chem. Biol. **4**(3), 283-6.
- Bohren, K. M. and Grimshaw, C. E. (2000). *The sorbinil trap: a predicted dead-end complex confirms the mechanism of aldose reductase inhibition*. Biochemistry **39**(32), 9967-74.
- Bohren, K. M.; Grimshaw, C. E.; Lai, C.-J. et al. (1994). *Tyrosine-48 Is the Proton Donor and Histidine-110 Directs Substrate Stereochemical Selectivity in the Reduction Reaction of Human Aldose Reductase: Enzyme Kinetics and Crystal Structure of the Y48H Mutant Enzyme*. Biochemistry **33**, 2021-2032.
- Bohren, K. M.; Page, J. L.; Shankar, R. et al. (1991). *Expression of Human Aldose and Aldehyde Reductases*. J. Biol. Chem. **266**(35), 24031-24037.
- Borhani, D. W.; Harters, T. M. and Petrash, J. M. (1992). *The Crystal Structure of the Aldose Reductase NADPH Binary Complex*. J. Biol. Chem. **267**(34), 24841-24847.
- Brenk, R.; Naerum, L.; Gradler, U. et al. (2003). *Virtual screening for submicromolar leads of tRNA-guanine transglycosylase based on a new unexpected binding mode detected by crystal structure analysis*. J. Med. Chem. **46**(7), 1133-43.
- Brownlee, M. (2001). *Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications*. Nature **414**(6865), 813-20.

Brünger, A. T.; Adams, P. D.; Clore, G. M. et al. (1998). *Crystallography & NMR system: A new software suite for macromolecular structure determination*. Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr. **54**(Pt 5), 905-21.

Bruno, I. J.; Cole, J. C.; Lommerse, J. P. et al. (1997). *IsoStar: a library of information about nonbonded interactions*. J. Comput.-Aided Mol. Des. **11**(6), 525-37.

Cachau, R.; Howard, E.; Barth, P. et al. (2000). *Model of the catalytic mechanism of human aldose reductase based on quantum chemical calculations*. J. Phys. IV France **10**, 3-13.

Calderone, V.; Chevrier, B.; Van Zandt, M. et al. (2000). *The structure of human aldose reductase bound to the inhibitor IDD384*. Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr. **56**(Pt 5), 536-40.

Carell, T.; Wintner, E. A.; Sutherland, A. J. et al. (1995). *New promise in combinatorial chemistry: synthesis, characterization, and screening of small-molecule libraries in solution*. Chem. Biol. **2**(3), 171-83.

Carlson, H. A. (2002a). *Protein flexibility and drug design: how to hit a moving target*. Curr. Opin. Chem. Biol. **6**(4), 447-52.

Carlson, H. A. (2002b). *Protein flexibility is an important component of structure-based drug discovery*. Curr. Pharm. Des. **8**(17), 1571-8.

Carlson, H. A. and McCammon, J. A. (2000). *Accommodating protein flexibility in computational drug design*. Mol. Pharmacol. **57**(2), 213-8.

Carper, D. A.; Hohmann, T. C. and Old, S. E. (1995). *Residues affecting the catalysis and inhibition of rat lens aldose reductase*. Biochim. Biophys. Acta(1246), 67-73.

Amber 6.0 (1999). Case, D. A.; Pearlman, D. A.; Caldwell, J. W. et al., University of California, San Francisco.

Amber 7.0 (2002). Case, D. A.; Pearlman, D. A.; Caldwell, J. W. et al., University of California, San Francisco.

Chaplin, M. (2002). *Enzyme Technology*, <http://www.sbu.ac.uk/biology/enztech/ph.html>

Claussen, H.; Buning, C.; Rarey, M. et al. (2001). *FlexE: efficient molecular docking considering protein structure variations*. J. Mol. Biol. **308**(2), 377-95.

Copeland, R. A. (1996). *Enzymes: a practical introduction to structure, mechanism, and data analysis*. VCH Publishers Inc., New York.

Cornell, W. D.; Cieplak, P.; Bayly, C. I. et al. (1995). *A second generation force field for the simulation of proteins, nucleic acids, and organic molecules*. J. Am. Chem. Soc. **117**, 5179-5197.

Cornell, W. D.; Cieplak, P.; Bayly, C. I. et al. (1993). *Application of RESP charges to calculate conformational energies, hydrogen bond energies, and free energies of solvation*. J. Am. Chem. Soc. **115**(21), 9620-9631.

Costantino, L.; Del Corso, A.; Rastelli, G. et al. (2001). *7-Hydroxy-2-substituted-4-H-1-benzopyran-4-one derivatives as aldose reductase inhibitors: a SAR study*. Eur. J. Med. Chem. **36**(9), 697-703.

Costantino, L.; Rastelli, G.; Gamberini, M. C. et al. (1999). *1-Benzopyran-4-one antioxidants as aldose reductase inhibitors*. J. Med. Chem. **42**(11), 1881-93.

Costantino, L.; Rastelli, G.; Vescovini, K. et al. (1996). *Synthesis, Activity, and Molecular Modeling of a New Series of Tricyclic Pyridazinones as Selective Aldose Reductase Inhibitors*. J. Med. Chem. **39**(22), 4396-4405.

Da Settimo, F.; Primofiore, G.; Da Settimo, A. et al. (2001). *[1,2,4]Triazino[4,3-a]benzimidazole Acetic Acid Derivatives: A New Class of Selective Aldose Reductase Inhibitors*. J. Med. Chem. **44**(25), 4359-4369.

Darden, T.; York, D. and Pedersen, L. (1993). *Partical mesh Ewald-An $N \cdot \log(N)$ method for Ewald sums in large systems*. J. Chem. Phys. **98**, 10089-10092.

De Winter, H. L. and von Itzstein, M. (1995). *Aldose Reductase as a Target for Drug Design: Molecular Medeling Calculations on the Binding of Acyclic Sugar Substrates to the Enzyme*. Biochemistry **34**, 8299-8308.

- DeLano, W. L. (2002). *The PyMOL Molecular Graphics System*, <http://www.pymol.org>
- Doman, T. N.; McGovern, S. L.; Witherbee, B. J. et al. (2002). *Molecular docking and high-throughput screening for novel inhibitors of protein tyrosine phosphatase-1B*. J. Med. Chem. **45**(11), 2213-21.
- Donkor, I. O.; Abdel-Ghany, Y. S.; Kador, P. F. et al. (1999). *Synthesis and biological activity of aldose reductase inhibitors with Michael acceptor substituents*. Eur. J. Med. Chem. **34**, 253-243.
- Drews, J. (2000a). *Drug discovery today - and tomorrow*. Drug. Discov. Today **5**(1), 2-4.
- Drews, J. (2000b). *Drug discovery: a historical perspective*. Science **287**(5460), 1960-4.
- Dullweber, F. (2000). *Strukturelle und physikochemische Charakterisierung der Protein-Ligand-Wechselwirkung am Beispiel der Serinproteasen Thrombin und Trypsin*. Doktorarbeit. Philipps-Universität, Marburg.
- Dvornik, E.; Simard-Duquesne, N.; Krami, M. et al. (1973). *Polyol Accumulation in Galactosemic and Diabetic Rats: Control by an Aldose Reductase Inhibitor*. Science **182**, 1146-1148.
- Edward, J. T. and Nielsen, S. (1957). *Thiohydantoins. I. Ionization and ultraviolet absorption*. J. Chem. Soc., 5075-9.
- Ehrig, T.; Bohren, K. M.; Prendergast, F. G. et al. (1994). *Mechanism of aldose reductase inhibition: Binding of NADP⁺/NADPH and alrestatin-like inhibitors*. Biochemistry **33**(23), 7157-65.
- El-Kabbani, O.; Old, S. E.; Ginell, S. L. et al. (1999). *Aldose and aldehyde reductases: structure-function studies on the coenzyme and inhibitor-binding sites*. Mol. Vis. **5**, 20.
- El-Kabbani, O.; Wilson, D. K.; Petrash, M. et al. (1998). *Structural Features of the Aldose Reductase and Aldehyde Reductase Inhibitor-Binding Sites*. Mol. Vis. **4**, 19.
- Ewing, T. J.; Makino, S.; Skillman, A. G. et al. (2001). *DOCK 4.0: search strategies for automated molecular docking of flexible molecule databases*. J. Comput.-Aided Mol. Des. **15**(5), 411-28.

- Freire, E. (1998). *Statistical thermodynamic linkage between conformational and binding equilibria*. Adv. Protein Chem. **51**, 255-79.
- Fresneau, P.; Cussac, M.; Morand, J.-M. et al. (1998). *Synthesis, Activity, and Molecular Modeling of New 2,4-Dioxo-5-(naphthylmethylene)-3-thiazolidineacetic Acids and 2-Thioxo Analogues as Potent Aldose Reductase Inhibitors*. J. Med. Chem. **41**, 4706-15.
- Gaussian 98 (1998). Frisch, M. J.; Trucks, G., W.; Schlegel, H. B. et al., Gaussian Inc., Pittsburgh (PA).
- Fukada, H. and Takahashi, K. (1998). *Enthalpy and heat capacity changes for the proton dissociation of various buffer components in 0.1 M potassium chloride*. Proteins **33**(2), 159-66.
- Moloc 01/05/08 (2001). Gerber, P., Gerber Molecular Design, Amden (Switzerland).
- Gohlke, H.; Hendlich, M. and Klebe, G. (2000a). *Knowledge-based Scoring Function to Predict Protein-Ligand Interactions*. J. Mol. Biol. **295**, 337-356.
- Gohlke, H.; Hendlich, M. and Klebe, G. (2000b). *Predicting binding modes, binding affinities and 'hot spots' for protein-ligand complexes using a knowledge-based scoring function*. Perspect. Drug Discov. Des. **20**, 115-144.
- Gohlke, H. and Klebe, G. (2002a). *Ansätze zur Beschreibung und Vorhersage der Bindungsaffinität niedermolekularer Liganden an makromolekulare Rezeptoren*. Angew. Chem. **114**, 2764-2798.
- Gohlke, H. and Klebe, G. (2002b). *DrugScore meets CoMFA: adaptation of fields for molecular comparison (AFMoC) or how to tailor knowledge-based pair-potentials to a particular protein*. J. Med. Chem. **45**(19), 4153-70.
- Good, A. (2001). *Structure-based virtual screening protocols*. Curr. Opin. Drug Discov. Devel. **4**(3), 301-7.
- Good, A. C.; Krystek, S. R. and Mason, J. S. (2000). *High-throughput and virtual screening: core lead discovery technologies move towards integration*. Drug. Discov. Today **5**(12 Suppl 1), 61-69.

- Goodford, P. J. (1985). *A computational procedure for determining energetically favorable binding sites on biologically important macromolecules*. J. Med. Chem. **28**(7), 849-57.
- Griffin, B. W. and McNatt, L. G. (1986). *Characterization of the reduction of 3-acetylpyridine adenine dinucleotide phosphate by benzyl alcohol catalyzed by aldose reductase*. Arch. Biochem. Biophys. **246**(1), 75-81.
- Grüneberg, S.; Stubbs, M. T. and Klebe, G. (2002). *Successful virtual screening for novel inhibitors of human carbonic anhydrase: strategy and experimental confirmation*. J. Med. Chem. **45**(17), 3588-602.
- Gunther, J.; Bergner, A.; Hendlich, M. et al. (2003). *Utilising structural knowledge in drug design strategies: applications using Relibase*. J. Mol. Biol. **326**(2), 621-36.
- Hajduk, P. J.; Dinges, J.; Miknis, G. F. et al. (1997). *NMR-based discovery of lead inhibitors that block DNA binding of the human papillomavirus E2 protein*. J. Med. Chem. **40**(20), 3144-50.
- Halperin, I.; Ma, B.; Wolfson, H. et al. (2002). *Principles of docking: An overview of search algorithms and a guide to scoring functions*. Proteins **47**(4), 409-43.
- Hanefeld, W. and Schlitzer, M. (1995). *Synthesis of 3-Aminorhodanine Derivatives as Aldose Reductase Inhibitors*. J. Heterocyclic Chem. **32**, 1919-1925.
- Hann, M. M.; Leach, A. R. and Harper, G. (2001). *Molecular complexity and its impact on the probability of finding leads for drug discovery*. J. Chem. Inf. Comput. Sci. **41**(3), 856-64.
- Harrison, D. H.; Bohren, K. M.; Ringe, D. et al. (1994). *An anion binding site in human aldose reductase: mechanistic implications for the binding of citrate, cacodylate, and glucose 6-phosphate*. Biochemistry **33**(8), 2011-20.
- Hendlich, M. (1998). *Databases for protein-ligand complexes*. Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr. **54**(Pt 6 Pt 1), 1178-82.
- Hendlich, M.; Bergner, A.; Gunther, J. et al. (2003). *Relibase: design and development of a database for comprehensive analysis of protein-ligand interactions*. J. Mol. Biol. **326**(2), 607-20.

Howard, E.; Sanishvili, R.; Cachau, R. E. et al. (submitted). *Human aldose reductase - inhibitor complex at 0.66Å: experimentally observed protonation states and atomic interactions have implications for the inhibition mechanism*. Proteins.

Humphrey, W.; Dalke, A. and Schulten, K. (1996). *VMD - Visual Molecular Dynamics*. J. Mol. Graph. **14**, 33-38.

Hurst, T. (1994). *Flexible 3D searching: The directed tweak technique*. J. Chem. Inf. Comput. Sci. **34**, 190-196.

Inglese, J. (2002). *Expanding the HTS paradigm*. Drug. Discov. Today **7**(18 Suppl), 105-6.

Inoue, J.; Cui, Y.-S.; Rodriguez, L. et al. (1999). *Synthesis and aldose reductase inhibitory activities of novel dibenzocycloheptenone derivatives*. Eur. J. Med. Chem. **34**, 399-404.

Iwata, Y.; Arisawa, M.; Hamada, R. et al. (2001). *Discovery of novel aldose reductase inhibitors using a protein structure-based approach: 3D-database search followed by design and synthesis*. J. Med. Chem. **44**(11), 1718-28.

James, P. (1997). *Of genomes and proteomes*. Biochem. Biophys. Res. Commun. **231**(1), 1-6.

Jencks, W. P. (1981). *On the attribution and additivity of binding energies*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **78**(7), 4046-50.

Jenkins, J. L.; Kao, R. Y. and Shapiro, R. (2003). *Virtual screening to enrich hit lists from high-throughput screening: A case study on small-molecule inhibitors of angiogenin*. Proteins **50**(1), 81-93.

Jones, G.; Willett, P.; Glen, R. C. et al. (1997). *Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking*. J. Mol. Biol. **267**(3), 727-48.

Jorgensen, W. L.; Chandrasekhar, J.; Madura, J. P. et al. (1983). *Comparison of simple potential functions for simulating liquid water*. J. Chem. Phys. **79**, 926-935.

Kador, P. F.; Lee, Y. S.; Rodrigues, L. et al. (1995). *Identification of an aldose reductase inhibitor site by affinity labeling*. Bioorg. Med. Chem. **3**, 1313-1324.

Karplus, M. (2002). *Molecular Dynamics Simulations of Biomolecules (Editorial)*. Acc. Chem. Res. **35**(6), 321-323.

Kato, K.; Nakayama, K.; Mizota, M. et al. (1991). *Properties of novel aldose reductase inhibitors, M16209 and M16287, in comparison with known inhibitors, ONO-2235 and sorbinil*. Chem. Pharm. Bull. **39**(6), 1540-5.

Kenyon, G. L.; DeMarini, D. M.; Fuchs, E. et al. (2002). *Defining the Mandate of Proteomics in the Post-Genomics Era: Workshop Report*. Mol. Cell Proteomics **1**(10), 763-80.

King, H.; Aubert, R. E. and Herman, W. H. (1998). *Global burden of diabetes, 1995-2025: prevalence, numerical estimates, and projections*. Diabetes Care **21**(9), 1414-31.

Kinoshita, J. H. (1974). *Mechanisms Initiating Cataract Formation. Proctor Lecture*. Invest. Ophthalmol. **13**, 713-724.

Klebe, G. (2000). *Recent developments in structure based drug design*. J. Mol. Med. **78**, 269-281.

Klebe, G.; Mietzner, T. and Weber, F. (1994). *Different approaches toward an automatic structural alignment of drug molecules: applications to sterol mimics, thrombin and thermolysin inhibitors*. J. Comput.-Aided Mol. Des. **8**(6), 751-78.

Kompella, U. B.; Sunkara, G.; Thomas, E. et al. (1999). *Rabbit corneal and conjunctival permeability of the novel aldose reductase inhibitors: N-[[4-(benzoylamino)phenyl] sulphonyl]glycines and N-benzoyl-N-phenylglycines*. J. Pharm. Pharmacol. **51**(8), 921-7.

Koshland Jr., D. E. (1958). *Application of a theory of enzyme specificity to protein synthesis*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **44**, 98-105.

Krämer, O. (1999). *Rationales Wirkstoff-Design am Beispiel der Aldose-Reduktase*. Diplomarbeit. Philipps-Universität, Marburg.

Krämer, O.; Böhm, M.; Schlitzer, M. et al. (2001). *3D-QSAR Analysis in Case of a Flexible Protein: CoMSLA Model for a Series of Aldose Reductase Inhibitors with Various Binding Modes*. in

Rational Approaches to Drug Design. H.-D. Höltje and W. Sippl. Prous Science S.A., Barcelona, Spain, 359-363.

Krämer, O.; Hazemann, I.; Podjarny, A. D. et al. (akzeptiert). *Ultra-high resolution drug design III: Virtual Screening for Inhibitors of Human Aldose Reductase*. Proteins.

Kubiseki, T. J. and Flynn, T. G. (1995). *Studies on Human Aldose Reductase. Probing the role of Arginine 268 by Site-directed Mutagenesis*. J. Biol. Chem. **270**(28), 16911-17.

Kubiseski, T. J.; Hyndman, D. J.; Morjana, N. A. et al. (1992). *Studies on pig muscle aldose reductase. Kinetic mechanism and evidence for a slow conformational change upon coenzyme binding*. J. Biol. Chem. **267**(10), 6510-7.

Kurono, M.; Fujiwara, I. and Yoshida, K. (2001). *Stereospecific interaction of a novel spirosuccinimide type aldose reductase inhibitor, AS-3201, with aldose reductase*. Biochemistry **40**(28), 8216-26.

Lahana, R. (1999). *How many leads from HTS?* Drug. Discov. Today **4**(10), 447-448.

Lander, E. S.; Linton, L. M.; Birren, B. et al. (2001). *Initial sequencing and analysis of the human genome*. Nature **409**(6822), 860-921.

Laskowski, R. A.; MacArthur, M. W.; Moss, D. S. et al. (1993). *PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures*. J. Appl. Cryst. **26**, 283-291.

GraFit 4.09 (1989-1999). Leatherbarrow, R. J., Erithacus Software Ltd., Horley (UK).

Lee, Y. S.; Chen, Z. and Kador, P. F. (1998a). *Molecular modeling studies of the binding modes of aldose reductase inhibitors at the active site of human aldose reductase*. Bioorg. Med. Chem. **6**(10), 1811-9.

Lee, Y. S.; Hodoscek, M.; Brooks, B. R. et al. (1998b). *Catalytic mechanism of aldose reductase studied by the combined potentials of quantum mechanics and molecular mechanics*. Biophys. Chem. **70**, 203-216.

- Lee, Y. S.; Hodoscek, M.; Kador, P. F. et al. (2003). *Hydrogen bonding interactions between aldose reductase complexed with NADP(H) and inhibitor tolrestat studied by molecular dynamics simulations and binding assay*. Chem. Biol. Interact. **143-144**, 307-16.
- Lee, Y. S.; Pearlstein, R. and Kador, P. F. (1994). *Molecular Modeling Studies of Aldose Reductase Inhibitors*. J. Med. Chem. **37**, 787-792.
- Lipinski, C. A.; Lombardo, F.; Dominy, B. W. et al. (1997). *Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings*. Advanced Drug Delivery Reviews **23**, 3-25.
- Liu, S. Q.; Bhatnagar, A. and Srivastava, S. K. (1992). *Does sorbinil bind to the substrate binding site of aldose reductase?* Biochem. Pharmacol. **44**(12), 2427-9.
- Löffler, G. and Petrides, P. E. (2003). *Biochemie und Pathobiochemie*. Springer, Berlin.
- Luque, I. and Freire, E. (2000). *Structural stability of binding sites: consequences for binding affinity and allosteric effects*. Proteins **Suppl**(4), 63-71.
- Lyne, P. D. (2002). *Structure-based virtual screening: an overview*. Drug. Discov. Today **7**(20), 1047-1055.
- Ma, B.; Kumar, S.; Tsai, C. J. et al. (1999). *Folding funnels and binding mechanisms*. Protein Eng. **12**(9), 713-20.
- Malamas, M. S.; Hohman, T. C. and Millen, J. (1994). *Novel spirosuccinimide aldose reductase inhibitors derived from isoquinoline-1,3-diones: 2-[(4-bromo-2-fluorophenyl)methyl]-6-fluorospiro[isoquinoline-4(1H),3'-pyrrolidine]-1,2',3,5'(2H)-tetrone and congeners. 1*. J. Med. Chem. **37**(13), 2043-58.
- Marelius, J.; Ljungberg, K. B. and Aqvist, J. (2001). *Sensitivity of an empirical affinity scoring function to changes in receptor-ligand complex conformations*. Eur. J. Pharm. Sci. **14**(1), 87-95.
- McCammon, J. A. and Wolynes, P. G. (2002). *Enlarging the landscape (Editorial)*. Curr. Opin. Struct. Biol. **12**(2), 143-145.

- Meyer, E. A.; Brenk, R.; Castellano, R. K. et al. (2002). *De novo design, synthesis, and in vitro evaluation of inhibitors for prokaryotic tRNA-guanine transglycosylase: a dramatic sulfur effect on binding affinity*. *Chembiochem* **3**(2-3), 250-3.
- Miranker, A. and Karplus, M. (1995). *An automated method for dynamic ligand design*. *Proteins* **23**(4), 472-90.
- Mittl, P. R. and Grutter, M. G. (2001). *Structural genomics: opportunities and challenges*. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **5**(4), 402-8.
- Miyamoto, S. (2002). *Recent advances in aldose reductase inhibitors: potential agents for the treatment of diabetic complications*. *Expert Opin. Ther. Patents* **12**(5), 621-631.
- Mizuno, K.; Kato, N.; Matsubara, A. et al. (1992). *Effects of a new aldose reductase inhibitor, (2S, 4S)-6-fluoro-2',5'-dioxospiro[chroman-4,4'-imidazolidine]-2-carboxamide (SNK-860), on the slowing of motor nerve conduction velocity and metabolic abnormalities in the peripheral nerve in acute streptozotocin-induced diabetic rats*. *Metabolism* **41**(10), 1081-6.
- Muegge, I.; Martin, Y. C.; Hajduk, P. J. et al. (1999). *Evaluation of PMF scoring in docking weak ligands to the FK506 binding protein*. *J. Med. Chem.* **42**(14), 2498-503.
- Mylari, B. L.; Larson, E. R.; Beyer, T. A. et al. (1991). *Novel, potent aldose reductase inhibitors: 3,4-dihydro-4-oxo-3-[[5-(trifluoromethyl)-2-benzothiazolyl] methyl]-1-phthalazineacetic acid (zopolrestat) and congeners*. *J. Med. Chem.* **34**(1), 108-22.
- Negoro, T.; Murata, M.; Ueda, S. et al. (1998). *Novel, highly potent aldose reductase inhibitors: (R)-(-)-2-(4-bromo-2-fluorobenzyl)-1,2,3,4-tetrahydropyrrolo[1,2-a]pyrazine-4-spiro-3'-pyrrolidine-1,2',3,5'-tetrone (AS-3201) and its congeners*. *J. Med. Chem.* **41**(21), 4118-29.
- Oates, P. J. (2002). *Polyol pathway and diabetic peripheral neuropathy*. *Int. Rev. Neurobiol.* **50**, 325-92.
- Oka, M.; Matsumoto, Y.; Sugiyama, S. et al. (2000). *A potent aldose reductase inhibitor, (2S,4S)-6-fluoro-2', 5'- dioxospiro[chroman-4,4'-imidazolidine]-2-carboxamide (Fidarestat): its absolute configuration and interactions with the aldose reductase by X-ray crystallography*. *J. Med. Chem.* **43**(12), 2479-83.

Oliver, S. F. and Abell, C. (1999). *Combinatorial synthetic design*. Curr. Opin. Chem. Biol. **3**(3), 299-306.

Oliver, W. R., Jr.; Shenk, J. L.; Snaith, M. R. et al. (2001). *A selective peroxisome proliferator-activated receptor delta agonist promotes reverse cholesterol transport*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **98**(9), 5306-11.

Oprea, T. I.; Davis, A. M.; Teague, S. J. et al. (2001). *Is there a difference between leads and drugs? A historical perspective*. J. Chem. Inf. Comput. Sci. **41**(5), 1308-15.

Österberg, F.; Morris, G. M.; Sanner, M. F. et al. (2002). *Automated docking to multiple target structures: incorporation of protein mobility and structural water heterogeneity in AutoDock*. Proteins **46**(1), 34-40.

Otwinowski, Z. and Minor, W. (1997). *Processing of X-ray Diffraction Data Collected in Oscillation Mode*. in *Methods in Enzymology: Macromolecular Crystallography, Part A*. C. W. Carter Jr. and R. M. Sweet. Academic Press, . **276**, 307-326.

Page, M. J.; Amess, B.; Rohlf, C. et al. (1999). *Proteomics: a major new technology for the drug discovery process*. Drug. Discov. Today **4**(2), 55-62.

Paiva, A. M.; Vanderwall, D. E.; Blanchard, J. S. et al. (2001). *Inhibitors of dihydrodipicolinate reductase, a key enzyme of the diaminopimelate pathway of Mycobacterium tuberculosis*. Biochim. Biophys. Acta **1545**(1-2), 67-77.

Pan, Y.; Huang, N.; Cho, S. et al. (2002). *Consideration of Molecular Weight during Compound Selection in Virtual Target-Based Database Screening*. J. Chem. Inf. Comput. Sci. **43**(1), 267-72.

Pegg, S. C.; Haresco, J. J. and Kuntz, I. D. (2001). *A genetic algorithm for structure-based de novo design*. J. Comput.-Aided Mol. Des. **15**(10), 911-33.

Petrash, J. M.; Harter, T. M.; Devine, C. S. et al. (1992). *Involvement of cysteine residues in catalysis and inhibition of human aldose reductase. Site-directed mutagenesis of Cys-80, -298, and -303*. J. Biol. Chem. **267**(34), 24833-40.

- Petrash, J. M.; Tarle, I.; Wilson, D. K. et al. (1994). *Aldose Reductase Catalysis and Crystallography. Insights from Recent Advances in Enzyme Structure and Function*. Diabetes **43**, 955-959.
- Phillips, M. A. (1928). *Formation of 2-methylbenzimidazoles*. J. Chem. Soc., 172-7.
- Poulsom, R. (1987a). *Comparison of aldose reductase inhibitors in vitro. Effects of enzyme purification and substrate type*. Biochem. Pharmacol. **36**(10), 1577-81.
- Poulsom, R. (1987b). *Inhibition of aldose reductase from human retina*. Curr. Eye Res. **6**(3), 427-32.
- Preston, B. N. (1974). *Synthesis, Reactions, and Spectroscopic Properties of Benzimidazoles*. Chem. Rev. **74**, 279-314.
- Rarey, M.; Kramer, B.; Lengauer, T. et al. (1996a). *A fast flexible docking method using an incremental construction algorithm*. J. Mol. Biol. **261**(3), 470-489.
- Rarey, M.; Wefing, S. and Lengauer, T. (1996b). *Placement of medium-sized molecular fragments into active sites of proteins*. J. Comput.-Aided Mol. Des. **10**, 41-54.
- Rastelli, G.; Antolini, L.; Benvenuti, S. et al. (2000). *Structural bases for the inhibition of aldose reductase by phenolic compounds [In Process Citation]*. Bioorg. Med. Chem. **8**(5), 1151-8.
- Rastelli, G. and Costantino, L. (1998a). *Molecular dynamics simulations of the structure of aldose reductase complexed with the inhibitor tolrestat*. Bioorg. Med. Chem. Lett. **8**(6), 641-646.
- Rastelli, G.; Costantino, L.; Gamberini, M. C. et al. (2002a). *Binding of 1-Benzopyran-4-one Derivatives to Aldose Reductase: A Free Energy Perturbation Study*. Bioorg. Med. Chem. **10**(5), 1427-36.
- Rastelli, G.; Costantino, L.; Vianello, P. et al. (1998b). *Free Energy Perturbation Studies on Binding of the Inhibitor 5,6-dihydrobenzo[h]cinnolin-3(2H)one-2-acetic acid and its Methoxylated Analogs to Aldose Reductase*. Tetrahedron **54**, 9415-9428.
- Rastelli, G.; Ferrari, A. M.; Costantino, L. et al. (2002b). *Discovery of new inhibitors of aldose reductase from molecular docking and database screening*. Bioorg. Med. Chem. **10**(5), 1437-1450.

Rastelli, G.; Vianello, P.; Barlocco, D. et al. (1997). *Structure-based design of an inhibitor modeled at the substrate active site of aldose reductase*. Bioorg. Med. Chem. Lett. **7**(14), 1897-1902.

Richter, P.; Garbe, C. and Wagner, G. (1974). *Synthese von Amidinophenylessigsäuren und Amidinophenyl- α -aminoessigsäuren*. Pharmazie **29**, 256-262.

Rishton, G. M. (1997). *Reactive compounds and in vitro false positives in HTS*. Drug. Discov. Today **2**(9), 382-384.

Rondeau, J. M.; Tete-Favier, F.; Podjarny, A. et al. (1992). *Novel NADPH-Binding Domain Revealed by the Crystal Structure of Aldose Reductase*. Nature **355**, 469-472.

Ryckaert, J. P.; Ciccotti, G. and Berendsen, H. J. C. (1977). *Numerical integration of the Cartesian equations of motion of a system with constraints: molecular dynamics of n-alkanes*. J. Comput. Phys. **23**, 327-341.

Sadowski, J. (1997). *A hybrid approach for addressing ring flexibility in 3D database searching*. J. Comput.-Aided Mol. Des. **11**(1), 53-60.

Sarges, R. and Peterson, M. J. (1986). *Sorbinil: A Member of the Novel Class of Spirohydantoin Aldose Reductase Inhibitors*. Metabolism **35**(4 Suppl 1), 101-104.

Schneider, G. and Böhm, H. J. (2002). *Virtual screening and fast automated docking methods*. Drug. Discov. Today **7**, 64-70.

Sestanj, K.; Bellini, F.; Fung, S. et al. (1984). *N-[5-(trifluoromethyl)-6-methoxy-1-naphthalenyl]thioxomethyl]-N-methylglycine (Tolrestat), a potent, orally active aldose reductase inhibitor*. J. Med. Chem. **27**(3), 255-6.

Sheldrick, G. M. and Schneider, T. R. (1997). *SHELXL: High-Resolution Refinement*. in *Methods in Enzymology: Macromolecular Crystallography, Part B*. M. I. Simon and J. N. Abelson. Academic Press, . **277**, 319.

- Shuker, S. B.; Hajduk, P. J.; Meadows, R. P. et al. (1996). *Discovering high-affinity ligands for proteins: SAR by NMR*. Science **274**(5292), 1531-4.
- Silber, K. (2002). *Ligand- und Rezeptor-basierte Suchstrategien zum Auffinden neuer Proteininhibitoren*. Diplomarbeit. Philipps-Universität, Marburg.
- Sills, M. A. (1998). *Future considerations in HTS: the acute effect of chronic dilemmas*. Drug. Discov. Today **3**(7), 304-312.
- Singh, S. B.; Malamas, M. S.; Hohman, T. C. et al. (2000). *Molecular modeling of the aldose reductase-inhibitor complex based on the X-ray crystal structure and studies with single-site-directed mutants*. J. Med. Chem. **43**(6), 1062-70.
- Smith, A. (2002). *Screening for drug discovery: the leading question*. Nature **418**(6896), 453-9.
- Sohda, T.; Mizuno, K.; Imamiya, E. et al. (1982). *Studies on antidiabetic agents. III. 5-Arylthiazolidine-2,4-diones as potent aldose reductase inhibitors*. Chem. Pharm. Bull. **30**(10), 3601-16.
- Sottriffer, C.; Klebe, G.; Stahl, M. et al. (2003). *Docking and Scoring Functions and Virtual Screening*. in *Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery*. D. J. Abraham. Wiley, New York.
- Sottriffer, C. A. (in press). *Molecular Dynamics Simulations in Drug Design*. in *Encyclopedic Reference of Genomics and Proteomics*. K. Ruckpaul and D. Genten. Springer, Heidelberg.
- Sottriffer, C. A.; Gohlke, H. and Klebe, G. (2002). *Docking into knowledge-based potential fields: a comparative evaluation of DrugScore*. J. Med. Chem. **45**(10), 1967-70.
- Stahl, M. and Rarey, M. (2001). *Detailed Analysis of Scoring Functions for Virtual Screening*. J. Med. Chem. **44**, 1035-1042.
- Steppan, C. M.; Bailey, S. T.; Bhat, S. et al. (2001). *The hormone resistin links obesity to diabetes*. Nature **409**(6818), 307-12.
- Stribling, D.; Mirrlees, D. J.; Harrison, H. E. et al. (1985). *Properties of ICI 128,436, a novel aldose reductase inhibitor, and its effects on diabetic complications in the rat*. Metabolism **34**(4), 336-44.

- Swindells, M. B. and Overington, J. P. (2002). *Prioritizing the proteome: identifying pharmaceutically relevant targets*. Drug. Discov. Today **7**(9), 516-21.
- Tanaka, Y.; Sawamoto, T.; Suzuki, A. et al. (1993). *Pharmacokinetics of zenarestat, an aldose reductase inhibitor, in male and female diabetic rats*. Drug Metab. Dispos. **21**(4), 677-81.
- Tarle, I.; Borhani, D. W.; Wilson, D. K. et al. (1993). *Probing the active site of human aldose reductase. Site-directed mutagenesis of Asp-43, Tyr-48, Lys-77, and His-110*. J. Biol. Chem. **268**(34), 25687-93.
- Terashima, H.; Hama, K.; Yamamoto, R. et al. (1984). *Effects of a new aldose reductase inhibitor on various tissues in vitro*. J. Pharmacol. Exp. Ther. **229**(1), 226-30.
- Urzhumtsev, A.; Tete-Favier, F.; Mitschler, A. et al. (1997). *A 'specificity' pocket inferred from the crystal structures of the complexes of aldose reductase with the pharmaceutically important inhibitors tolrestat and sorbinil*. Structure **5**(5), 601-12.
- Van Zandt, M. C.; Sibley, E. O.; Combs, K. J. et al. (1999). *Design and synthesis of novel inhibitors of aldose reductase for the treatment of diabetic complications*. 218th ACS National Meeting, New Orleans, American Chemical Society.
- Varnai, P. and Warshel, A. (2000). *Computer Simulation Studies of the Catalytic Mechanism of Human Aldose Reductase*. J. Am. Chem. Soc. **122**, 3849-3860.
- Venter, J. C. (2003). *A part of the human genome sequence*. Science **299**(5610), 1183-4.
- Venter, J. C.; Adams, M. D.; Myers, E. W. et al. (2001). *The sequence of the human genome*. Science **291**(5507), 1304-51.
- Verdonk, M. L.; Cole, J. C. and Taylor, R. (1999). *SuperStar: a knowledge-based approach for identifying interaction sites in proteins*. J. Mol. Biol. **289**(4), 1093-108.
- Verdonk, M. L.; Cole, J. C.; Watson, P. et al. (2001). *SuperStar: improved knowledge-based interaction fields for protein binding sites*. J. Mol. Biol. **307**(3), 841-59.

- Viswanadhan, V. N.; Ghose, A. K.; Revankar, G. R. et al. (1989). *Atomic physicochemical parameters for three-dimensional structure directed quantitative structure-activity relationships. 4. Additional parameters for hydrophobic and dispersive interactions and their application for an automated superposition of certain naturally occurring nucleoside antibiotics*. J. Chem. Inf. Comput. Sci. **29**, 163-72.
- Walters, W. P.; Stahl, M. T. and Murcko, M. A. (1998). *Virtual screening: an overview*. Drug. Discov. Today **3**, 160-178.
- Wang, J.; Cieplak, P. and Kollman, P. A. (2000). *How well does a restrained electrostatic potential (RESP) model perform in calculating conformational energies of organic and biological molecules?* J. Comput. Chem. **21**(12), 1049-1074.
- Waterston, R. H.; Lander, E. S. and Sulston, J. E. (2002). *On the sequencing of the human genome*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **99**(6), 3712-6.
- Waterston, R. H.; Lander, E. S. and Sulston, J. E. (2003). *More on the sequencing of the human genome*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **100**(6), 3022-3024.
- Wermuth, C. G. (1996). *Molecular Variations Based on Isosteric Replacements*. in *The Practice of Medicinal Chemistry*. C. G. Wermuth. Academic Press, .
- Westbrook, J.; Feng, Z.; Chen, L. et al. (2003). *The Protein Data Bank and structural genomics*. Nucleic Acids Res. **31**(1), 489-91.
- Willson, T. M.; Lambert, M. H. and Kliewer, S. A. (2001). *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma and metabolic disease*. Annu. Rev. Biochem. **70**, 341-67.
- Wilson, D. K.; Bohren, K. M.; Gabbay, K. H. et al. (1992). *An Unlikely Sugar Substrate Site in the 1.65 Å Structure of the Human Aldose Reductase Holoenzyme Implicated in Diabetic Complications*. Science **257**, 81-84.
- Wilson, D. K.; Nakano, T.; Petrash, J. M. et al. (1995). *1.7 Å structure of FR-1, a fibroblast growth factor-induced member of the aldo-keto reductase family, complexed with coenzyme and inhibitor*. Biochem. **34**(44), 14323-30.

Wilson, D. K.; Quirocho, F. A. and Petrash, J. M. (1997). *Structural Studies on Aldose Reductase Inhibition*. in *Structure-Based Drug Design*. P. Veerapandian. Marcel Dekker Inc., New York, 229-246.

Wilson, D. K.; Tarle, I.; Petrash, J. M. et al. (1993). *Refined 1.8 Å structure of human aldose reductase complexed with the potent inhibitor zopolrestat*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **90**(21), 9847-51.

Yabe-Nishimura, C. (1998). *Aldose reductase in glucose toxicity: a potential target for the prevention of diabetic complications*. Pharmacol. Rev. **50**(1), 21-33.

Zief, M. and Edsall, J. T. (1937). *Studies in the physical chemistry of amino acids, peptides and related substances. IX. The dissociation constants of some amino acid derivatives*. J. Am. Chem. Soc. **59**, 2245-8.

Zimmet, P.; Alberti, K. G. and Shaw, J. (2001). *Global and societal implications of the diabetes epidemic*. Nature **414**(6865), 782-7.

Lebenslauf

Oliver Krämer

Geburtstag:	6. November 1972
Geburtsort:	Hüttental jetzt Siegen
1983 – 1992	Evangelisches Gymnasium in Siegen-Weidenau
Juni 1992	Allgemeine Hochschulreife
1992 – 1993	Zivildienst in der Behindertenwerkstatt der Arbeiterwohlfahrt e.V., Siegen-Deuz
1993	Immatrikulation im Studiengang Diplom-Chemie an der Universität-GH Siegen
November 1995	Diplom-Vorprüfung
1995 – 1999	Haupt-Studiengang Diplom-Chemie an der Philipps-Universität Marburg
1996	Forschungspraktikum bei der Bayer AG, Leverkusen
1997	Forschungspraktikum bei der BASF AG, Ludwigshafen
August 1998	Diplom-Prüfung
1998 – 1999	Anfertigung der Diplomarbeit „Rationales Wirkstoff-Design am Beispiel der Aldose Reduktase“ unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Gerhard Klebe am Institut für Pharmazeutische Chemie der Philipps-Universität Marburg
Juli 1999	Verleihung des akademischen Grades „Diplom-Chemiker“
1999 – 2003	Anfertigung der vorliegenden Dissertation unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Gerhard Klebe am Institut für Pharmazeutische Chemie der Philipps-Universität Marburg
1999 – 2003	Wissenschaftlicher Mitarbeiter am selbigen Institut; Betreuung des Studentenpraktikums „Qualitative Analyse anorganischer Stoffe“ (1. Semester Pharmazie)

Erklärung

Ich versichere, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Marburg, im April 2003